



Hinc patriam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia**  
**Universidade Técnica de Lisboa**

## **VALORIZAÇÃO DO TOMATE**

**Extracção supercrítica de compostos bioactivos a partir de repiso  
de tomate**

**Sandra Filipa dos Santos Domingos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientador: Professora Doutora Margarida Moldão Martins

Co – Orientador: Doutora Sara Maria Martins Beirão da Costa Teixeira de Barros

### **Júri:**

Presidente: Doutor Raul Filipe Xisto Bruno de Sousa, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: Doutora Maria Gabriela Bernardo Gil, Professora Associada do Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa

Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Doutora Sara Maria Martins Beirão da Costa Teixeira de Barros

**Lisboa, 2009**

# AGRADECIMENTOS

A realização do presente trabalho só foi possível com o apoio e a colaboração de diversas pessoas e instituições que, de alguma forma, contribuíram para o seu desenvolvimento. Pelo apoio particularmente relevante justifica-se um agradecimento especial:

À Professora Doutora Engenheira Margarida Moldão Martins, minha orientadora, pela possibilidade que me concedeu de realizar este trabalho, assim como por todo o apoio, compreensão, inteira disponibilidade e orientação prestada.

À Doutora Engenheira Sara Beirão da Costa Teixeira de Barros, minha co-orientadora, pela sua inteira disponibilidade na realização dos ensaios experimentais e análise de resultados, e pelo seu incentivo, enorme compreensão e conhecimentos transmitidos.

À Engenheira Cláudia Duarte, pela sua enorme disponibilidade na realização dos ensaios experimentais e na análise de resultados, pelo apoio, incentivo e esclarecimentos prestados e pela amizade.

À Professora Doutora Engenheira Gabriela Bernardo Gil e à Engenheira Maria Albertina Ribeiro, por terem disponibilizado a instalação supercrítica para a realização dos ensaios de extracção e por todo o apoio prestado.

À Professora Doutora Engenheira Maria Luísa Beirão da Costa, pelo auxílio na análise de resultados.

Ao Engenheiro António Eduardo Leitão e à Elisabete, pela disponibilidade na realização das análises dos extractos por HPLC.

Ao Sr. Octávio Chaveiro, pela disponibilidade na realização das fotografias de microscopia electrónica.

Ao Sr. José Abrantes, pelo apoio prestado na instalação supercrítica.

A todo o pessoal de laboratório do DAIAT, em particular à Marília e à D. Graziela pela importante ajuda, amizade e esclarecimentos transmitidos durante a realização da parte prática. À D. Maria Júlia e à Rosário, pelo apoio, boa disposição e por terem sempre uma palavra amiga.

A todos os meus amigos, pela amizade e apoio.

Aos meus pais, pelo apoio, carinho, pela oportunidade que me deram e pelos esforços que fizeram para que eu chegasse até aqui.

À minha irmã, um agradecimento muito especial, por todo o carinho, apoio incondicional, cumplicidade, compreensão nas horas mais difíceis, pela sua presença e incentivo constante. O seu apoio foi muito importante para continuar e chegar ao fim.

# RESUMO

---

O presente trabalho centrou-se na extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico de licopeno, a partir de repiso de tomate, para posterior uso na indústria alimentar. Os estudos de extracção foram efectuados a uma pressão de 220 bar, temperatura de 45°C e sem adição de co-solventes. Foi testado o efeito do tempo de extracção e da granulometria das partículas, no rendimento da extracção. Foi ainda avaliado o efeito da aplicação de um tratamento prévio de extrusão no rendimento de carotenóides. Os extractos foram posteriormente analisados quanto ao seu teor em licopeno,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno e os resultados obtidos foram comparados com os alcançados na extracção por *n*-hexano.

Os resultados indicaram que, após 990 minutos de extracção, rendimentos de extracção superiores em carotenóides foram obtidos com repiso de tomate liofilizado moído e não sujeito a extrusão prévia. No entanto, quando comparada com a extracção por solventes orgânicos, a extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico nas condições testadas continua a conferir rendimentos de extracção mais baixos. A extrusão não implicou efeitos significativos no rendimento de extracção.

**Palavras-chave:** *Lycopersicum esculentum* Mill., Repiso, Carotenóides, Licopeno, Extracção, CO<sub>2</sub> Supercrítico.

# ABSTRACT

---

In this work, supercritical carbon dioxide extraction of lycopene from tomato industrial waste was investigated. The effects of extrusion (as pre-treatment), time of extraction and particle size on the extraction yield were evaluated. The experiments were carried out at a pressure of 220 bar and a temperature of 45°C, without any modifiers. The extracts were analyzed for lycopene,  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene content using high-performance liquid chromatography, and compared to a chemically extracted control.

The results indicated that, after 990 minutes of extraction, higher extraction yield of lycopene,  $\alpha$  - carotene and  $\beta$  - carotene were obtained with tomato industrial wastes lyophilized, ground and no extruded. However, when compared with solid-liquid extraction, supercritical carbon dioxide extraction gave extraction yield lower.

The extrusion didn't have a significant effect in the solid-liquid extraction.

**Keywords:** *Lycopersicum esculentum* Mill., Tomato industrial waste, Carotenoids, Lycopene, Extraction, Supercritical CO<sub>2</sub>.

# EXTENDED ABSTRACT

Lycopene is a carotenoid present in high concentration in tomatoes and tomato products, along with lesser amounts of  $\alpha$  - carotene and  $\beta$ -carotene. It is found predominantly in the chromoplasts of epicarp. This pigment is the principal component responsible for characteristic deep-red color of tomato and has attracted attention in different fields of research. Lycopene is considered to be a commercially important natural pigment for the emergent market of nutraceutical products due to its function as a health-promoting ingredient. The acyclic structure with 13 double bonds, 11 of which are conjugated, determine its high antioxidant activity. The singlet oxygen-quenching properties of lycopene and, thereby, its ability to trap peroxy radicals result in the reduction of the risk of developing atherosclerosis and coronary heart disease. Moreover, there are also a rising number of clinical evidences and epidemiological studies supporting the role of lycopene to provide protection against different types of cancer, such as prostate gland cancer, stomach cancer, and lung cancer. Evidence is now being obtained that suggests that lycopene may have direct stimulatory effects on the response of the immune system.

Lycopene is known to exist in a variety of geometric isomers, including *all-trans*, *mono-cis* and *poli-cis* forms. The *all-trans* configuration predominates in fresh tomatoes and gradually isomerizes to *Cis* configurations upon processing and storage of tomato products.

The tomato processing industry produces large amounts of solid waste that contain highly valuable biologically active compounds, including lycopene and other carotenoids. Recycling this by-product is of interest for an environmental and economical viewpoint and for the health benefits derived from the recovery of bioactive compounds now discharged. Every year, Portugal discharges approximately 55000 tons of tomato processing wastes. The fact that this waste are rich in skins and, consequently, in lycopene makes tomato industrial waste a suitable source of this carotenoid and its extraction a good alternative use for this by-product.

Typically, carotenoids and lycopene are extracted from foods by solid-liquid extraction, which consumes large volumes of organic solvents. Organic solvents are expensive, hazardous to use, and costly to dispose off. Concern about the environment has increased interest in alternative and reliable extraction techniques such as supercritical fluid extraction. Its non-toxicity and non-flammability are at least two reasons why carbon dioxide is the supercritical fluid in most common use. In addition, its low critical temperature that

allows its use to extract thermally labile compounds such as carotenoids and the lack of solvent residues are also huge advantages.

The main objective of the present work is to contribute for the study of supercritical carbon dioxide extraction of lycopene. The effects of extrusion (as pre-treatment), time of extraction and particle size on the extraction yield were evaluated. The experiments were carried out at a pressure of 220 bar and a temperature of 45°C, without any modifiers. The extracts were analyzed for lycopene,  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene content using high-performance liquid chromatography, and compared to a chemically extracted control. The results indicated that, after 990 minutes of extraction, higher extraction yield of lycopene,  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene were obtained with tomato industrial wastes lyophilized, ground and not extruded. However, when compared with solid-liquid extraction, supercritical carbon dioxide extraction gave extraction yield lower. The extrusion didn't have a significant effect in the solid-liquid extraction.

**Keywords:** *Lycopersicum esculentum* Mill., Tomato industrial waste, Carotenoids, Lycopene, Extraction, Supercritical CO<sub>2</sub>.

# Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	iii
Abstract .....	iv
Extended abstract .....	v
Índice .....	vii
Índice de Figuras .....	ix
Índice de Quadros .....	x
Enquadramento e Objectivos .....	xi
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>1</b>
1. Tomate .....	2
1.1. Origem e Importância Económica.....	2
1.2. Morfologia .....	3
1.3. Composição .....	4
2. Derivados e Subprodutos do Tomate – Concentrado de Tomate.....	8
3. Carotenóides.....	9
3.1. Características Físico – Químicas .....	9
3.2. Distribuição na Natureza.....	11
3.3. Biossíntese .....	11
3.4. Funções biológicas .....	13
3.4.1. Nas Plantas .....	13
3.4.2. No ser humano .....	14
3.5. Licopeno .....	15
3.5.1. Características Físico – Químicas .....	15
3.5.2. Ocorrência .....	16
3.5.3. Efeitos para a saúde humana.....	16
4. Metodologias de Extracção de Carotenóides .....	18
4.1. Extracção Sólido / Líquido .....	18
4.2. Extracção por Fluidos Supercríticos .....	18
4.2.1. Introdução .....	18



4.2.2.	Fundamentos da Extracção por Fluidos Supercríticos .....	19
4.2.3.	O Dióxido de Carbono como Fluido Supercrítico .....	21
4.2.4.	Utilizações do CO <sub>2</sub> Supercrítico no Domínio Alimentar .....	22
4.2.5.	Extracção de Carotenóides por CO <sub>2</sub> Supercrítico .....	22
5.	Pré tratamentos da matéria-prima - Extrusão .....	26
<b>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....</b>		<b>27</b>
6.	Materiais e Métodos.....	28
6.1.	Materiais .....	28
6.1.1.	Material vegetal .....	28
6.1.2.	Reagentes .....	28
6.2.	Métodos .....	29
6.2.1.	Preparação do Material Vegetal .....	29
6.2.2.	Caracterização do Material Vegetal.....	31
6.2.3.	Extracção de Carotenóides .....	34
6.2.4.	Análise dos Extractos por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) ..	40
7.	Resultados e Discussão.....	42
7.1.	Caracterização do Material Biológico .....	42
7.1.1.	Determinação da Granulometria.....	42
7.1.2.	Determinação das Densidades Aparente e Real.....	44
7.1.3.	Determinação das Substâncias Pécicas .....	45
7.1.4.	Fraccionamento da Fibra.....	47
7.1.5.	Observação da Microestrutura .....	48
7.2.	Extracção de Carotenóides.....	50
7.2.1.	Extracção Sólido / Líquido por <i>n</i> – Hexano .....	50
7.2.2.	Extracção por CO <sub>2</sub> Supercrítico.....	51
8.	Conclusões .....	56
9.	Referências Bibliográficas.....	58
10.	Anexos.....	64

## Índice de Figuras

Figura 1 - Produção mundial de tomate em Portugal.....	2
Figura 2 – Representação esquemática da morfologia do tomate.....	4
Figura 4 – Estrutura molecular dos carotenóides.....	9
Figura 5 – Estrutura molecular de alguns dos carotenóides mais comuns.....	10
Figura 6 – Biossíntese do licopeno. ....	12
Figura 7 – Biossíntese do $\beta$ e $\alpha$ - caroteno . ....	13
Figura 8 – Estrutura do licopeno . ....	15
Figura 9 – Diagrama pressão – temperatura para uma substância pura . ....	20
Figura 10 - Câmara de congelação do liofilizador.....	29
Figura 11 - Aparelhos de <i>Soxhlet</i> em funcionamento. ....	34
Figura 12 – Instalação supercrítica utilizada. ....	35
Figura 13 - Diagrama da instalação supercrítica.....	36
Figura 14 – Corpo do extractor sem tampa.....	37
Figura 15 – Extractor fechado. ....	37
Figura 16 - Zona de recolha dos extractos.....	38
Figura 17 – Histograma do repiso extrudido não moído. ....	43
Figura 18 – Histograma do repiso não extrudido moído. ....	43
Figura 19 – Histograma do repiso extrudido moído. ....	44
Figura 20 – Fotografias de SEM das amostras de repiso.....	49
Figura 21 - Curvas de extracção por <i>n</i> - hexano de repisos e extrudido não moído, não extrudido moído e extrudido moído.....	50
Figura 22 - Curvas de extracção por CO <sub>2</sub> supercrítico de repisos extrudido não moído, não extrudido moído e extrudido moído.....	52
Figura 23 - Curvas de extracção do licopeno obtidas na extracção por CO <sub>2</sub> supercrítico dos repisos extrudido não moído, não extrudido moído e extrudido moído. ....	53
Figura 24 - Curvas de extracção do alfa - caroteno obtidas na extracção por CO <sub>2</sub> supercrítico dos repisos extrudido não moído, não extrudido moído e extrudido moído.....	54
Figura 25 - Curvas de extracção do beta - caroteno obtidas na extracção por CO <sub>2</sub> supercrítico, a partir dos repisos extrudido não moído, não extrudido moído e extrudido moído. ....	54

## Índice de Quadros

Quadro 1 - Composição química do tomate maduro (valores expressos por 100 g de parte edível) .....	5
Quadro 2 - Condições de extracção utilizadas e rendimentos em licopeno obtidos em alguns estudos de extracção por CO <sub>2</sub> supercrítico de licopeno, a partir de repiso de tomate. ....	23
Quadro 3 - Condições óptimas de extrusão.....	30
Quadro 4 - Condições de extracção supercrítica mantidas constantes. ....	38
Quadro 5 - Densidade aparente e real do repiso extrudido não moído, não extrudido moído e extrudido moído.....	44
Quadro 6 – Teor em ácido galacturónico (a.g) presente nas diferentes fracções de substâncias pécicas, nas amostras de repiso extrudido moído e não extrudido moído antes e depois da extracção por CO <sub>2</sub> supercrítico, expresso em miligramas por mililitro (mg / ml).46	46
Quadro 7 – Teores de hemicelulose, celulose e lenhinha das amostras de repiso extrudido não moído, extrudido moído e não extrudido moído, antes e depois da extracção por CO <sub>2</sub> supercrítico, expressos em massa húmida. ....	48
Quadro 8 – Teores de licopeno, $\alpha$ - caroteno e $\beta$ - caroteno obtidos por extracção por $n$ – hexano.....	51
Quadro 9 – Teores de NDF, ADF e ADL obtidos para as amostras de repiso extrudido não moído, extrudido moído e não extrudido moído, antes e depois da extracção.....	68

## Enquadramento e Objectivos

A dieta alimentar habitual fornece, além dos macro e micronutrientes essenciais, alguns compostos químicos presentes, na sua maioria, nos produtos hortofrutícolas, que apresentam uma grande actividade biológica. Esses compostos designam-se por compostos bioactivos e podem ter benefícios na saúde humana.

O licopeno é um importante pigmento que se encontra presente sobretudo no tomate e seus produtos derivados e que é responsável pela cor vermelha que estes apresentam. Este pigmento tem atraído atenções, nos últimos anos, devido ao seu papel na manutenção da saúde e em muitos casos na prevenção de doenças, funcionando assim como um composto bioactivo. De entre os benefícios associados à sua ingestão constam a redução da incidência de alguns cancros, nomeadamente pulmões, estômago e próstata, e a prevenção de acidentes cardiovasculares (Shi e Le Maguer, 2000; Ollanketo, Riekkola, Hiltunen, 2001). Tais benefícios estão relacionados com a actividade antioxidante que este pigmento apresenta. O licopeno também tem vindo a assumir uma importância crescente na indústria alimentar ao ser adicionado aos alimentos processados como agente corante e antioxidante (Anónimo, 2003).

Os subprodutos da indústria alimentar representam cada vez mais um interesse acrescido do ponto de vista ambiental e, principalmente, económico. Esta importância torna-se ainda mais proeminente quando um sector tem elevado peso na economia, como é o caso da indústria hortofrutícola e, em particular, da indústria de transformação do tomate, que representa a principal e a mais competitiva produção horto industrial em Portugal (INE, 2008). Nos últimos 2 anos, Portugal processou uma média de 1100000 toneladas de tomate por ano, tendo descartado, só no período de Julho a Setembro, cerca de 55000 toneladas de subproduto por ano (Roca, 2009). Uma vez que este subproduto, repiso, é constituído essencialmente por películas e sementes, de elevado valor nutritivo, a sua valorização pode constituir um contributo para o desenvolvimento sustentável do sector agro-alimentar através de um completo aproveitamento das matérias-primas. Actualmente, o repiso tem como destino a alimentação animal, devido, sobretudo, ao seu elevado teor proteico e em fibra. No entanto, o facto do repiso ser rico em licopeno, faz com que a sua extracção seja uma excelente alternativa para valorização deste subproduto.

A extracção de carotenóides a partir de material vegetal é muitas vezes realizada através de solventes orgânicos, tais como *n*-hexano, acetona, clorofórmio e etanol. A toxicidade de alguns destes solventes, aliada à dificuldade na sua remoção completa (presença de resíduos de solvente no extracto) e à necessidade de usar temperaturas elevadas aquando a extracção, compromete a utilização deste tipo de extracção no domínio

alimentar. A extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico surge assim como uma alternativa à extracção por solventes orgânicos, uma vez que apresenta vantagens, no que diz respeito a questões ambientais e à qualidade dos produtos obtidos, pois é um processo livre de resíduos e não provoca a degradação do extracto. Esta técnica de extracção apresenta ainda a possibilidade de operar com alta selectividade e eficiência, permitindo a extracção diferencial de solutos.

Constituiu assim o objectivo principal do presente trabalho o estudo da extracção de carotenóides, nomeadamente o licopeno, por CO<sub>2</sub> supercrítico a pressões moderadas a partir de repiso de tomate. Pretendeu-se ainda aferir quanto à eficácia da extrusão como pré-tratamento do repiso, a fim de facilitar a extracção e assim aumentar o rendimento da mesma.

# **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

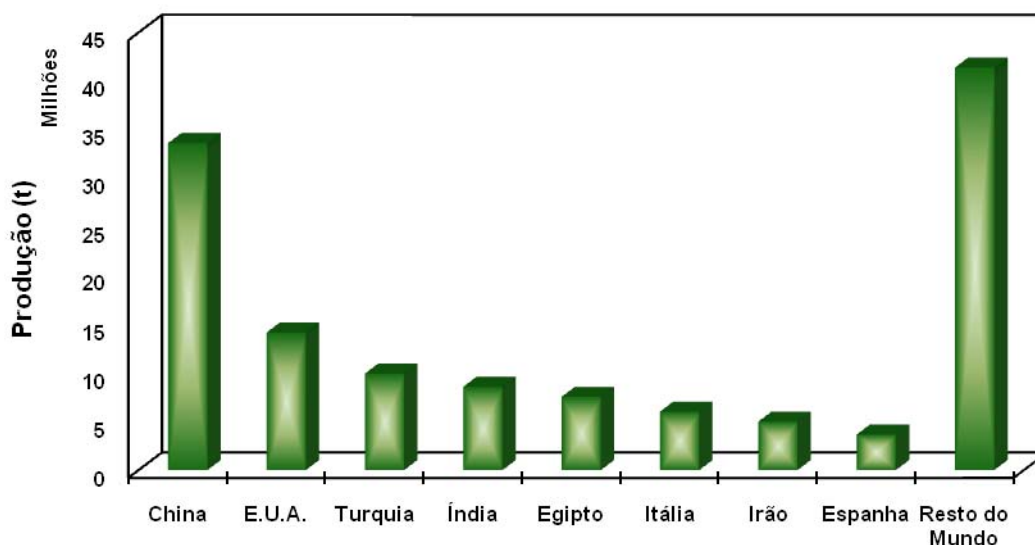
---

## 1. Tomate

### 1.1. Origem e Importância Económica

O tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) é o fruto do tomateiro, planta que pertence à família *Solanaceae* e que é originária da região dos Andes, mais concretamente da zona costeira ocidental da América do Sul, entre o Equador e o Chile (inclui ainda regiões da Colômbia, Bolívia e Peru) (Costa e Heuvelink, 2005; Almeida, 2006). A sua domesticação ocorreu no México, a partir de onde foi introduzido na Europa, em meados do século XVI (Costa e Heuvelink, 2005; Almeida, 2006). Na Europa, a nova cultura foi rapidamente adoptada pelos países do Sul, sobretudo Itália e Espanha, contudo, nos países do Norte e Centro foi temida como venenosa, tendo sido inicialmente utilizada principalmente como ornamental. A grande expansão mundial da cultura do tomate ocorreu nas primeiras décadas do século XX, em resultado do desenvolvimento da indústria de processamento de concentrado (Almeida, 2006).

Actualmente, o tomate é uma das culturas hortícolas mais importantes, em termos de produção e valor económico, uma vez que ocupa o segundo lugar em volume de produção Mundial e é uma das mais industrializadas. O sector do tomate e seus produtos transformados insere-se assim num mercado mundial muito competitivo dominado pela China com um volume anual de cerca de 33 milhões de toneladas, o que representa 26% da produção mundial (FAO, 2009). Os Estados Unidos da América (E.U.A) ocupam a 2ª posição no ranking mundial, sendo seguidos pela Turquia, Índia, Egipto, Itália, Irão e Espanha (FAO, 2009) (**Figura 1**).



**Figura 1** - Produção mundial de tomate em 2007 (Fonte: FAO, 2009).

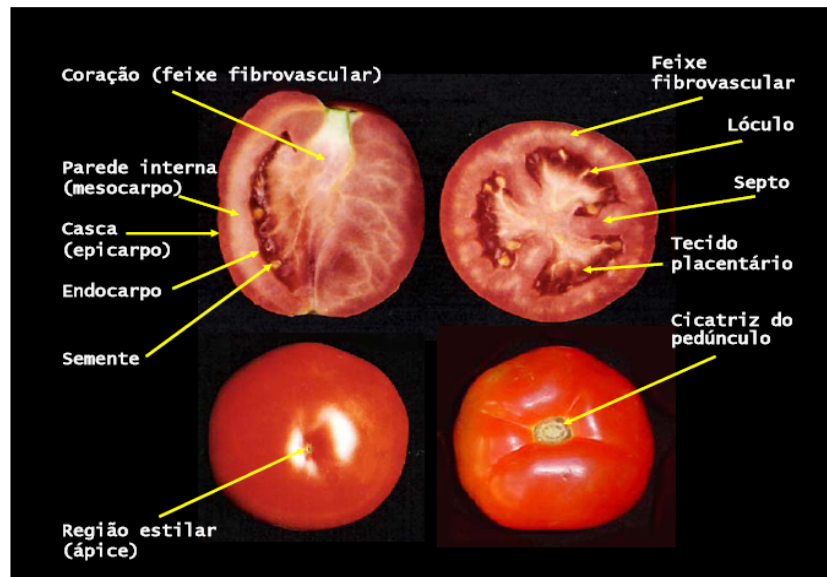
Nos últimos anos registou-se uma expansão da cultura do tomate como consequência do crescimento do seu consumo, tanto na forma de produto para consumo em fresco, como de produto transformado (concentrado, sumo, desidratado, ketchup, entre outros). Este consumo crescente está relacionado, entre outros factores, com a consolidação de redes de restaurante *fast - food* e *self-service* que utilizam esta cultura hortícola nas formas processada e fresca. Além disso, a presença da mulher no mercado de trabalho e a consequente necessidade de preparar os alimentos de forma mais rápida, aumentou a procura por alimentos processados ou semi-preparados – no caso do tomate, principalmente na forma de molhos pré-preparados ou prontos para consumo, como o *ketchup*. Mais recentemente, a procura pelo tomate foi reforçada pela busca de alimentos mais saudáveis, favorecendo também o crescimento da venda do produto para consumo em fresco (Carvalho e Pagliuca, 2007).

Em Portugal, o tomate para consumo em fresco e o tomate para indústria constituem duas das principais culturas produzidas, tendo tido, no ano de 2003, representatividades de 4,1% e 40,8%, respectivamente, na produção total de produtos hortícolas (GPP, 2007). A cultura do tomate para consumo em fresco assume maior importância nas regiões do Ribatejo e Oeste e Algarve, com, respectivamente, 50% e 30% do total da produção do Continente no quinquénio 1998-02 (GPP, 2007). O aprovisionamento do tomate para a indústria é na totalidade assegurado por Organizações de Produtores (OP) que se concentram, sobretudo, no Ribatejo (80% da área), vale do Tejo (Azambuja e Santarém), no vale do Sorraia (Coruche e Salvaterra de Magos) e nos regadios do Alentejo (19% da área) (Almeida, 2006 e GPP, 2007).

## 1.2. Morfologia

Botanicamente, o tomate é classificado como uma baga, estando dividido em pericarpo, lóculos ou cavidades loculares (variam de 2 a 12) e conteúdo locular (**Figura 2**) (Madhavi e Salunkhe, 1998; Almeida, 2006). O pericarpo é constituído por um epicarpo membranoso, revestido por uma cutícula rica em ceras e ácidos cuticulares, um mesocarpo carnudo e suculento e um endocarpo membranar muito ténue (Barringer, 2004). As sementes estão imersas no tecido locular ou placentário, tecido esse que, durante o amadurecimento, forma uma espécie de gel que preenche as cavidades loculares (Almeida, 2006). Após a maturação, o tomate apresenta geralmente uma cor vermelha, apesar de algumas variedades poderem apresentar outras cores como o amarelo, cor-de-rosa ou cor-de-laranja (Madhavi e Salunkhe, 1998; Almeida, 2006).





**Figura 2** – Representação esquemática da morfologia do tomate (Fonte: Melo, 2007).

### 1.3. Composição

A composição do tomate varia em função da variedade, estado de maturação e condições de produção (como a temperatura, fertilização e irrigação) (Barringer, 2004). No entanto, e de um maneira geral, o tomate maduro é composto sobretudo por água, representando esta cerca de 94% do total dos seus constituintes. Os restantes 6% correspondem a matéria seca, sendo esta constituída por 50% de açúcares solúveis (predominando a frutose e a glucose), 25% de ácidos orgânicos (cítrico e málico), aminoácidos dicarboxílicos, lípidos e minerais, e 25% de sólidos insolúveis em álcool, que incluem proteínas, substâncias pécticas, celulose e hemicelulose (Barringer, 2004; Roca, 2009).

A composição média do tomate encontra-se sistematizada na **Quadro 1**.

**Quadro 1** - Composição química do tomate maduro (valores expressos por 100 g de parte edível) (USDA, 2009).

Composto	Concentração	Composto	Concentração
Água (%)	94,5	Cinza (%)	0,50
<b>Matéria Seca</b>		<b>Minerais (mg / 100 g)</b>	
Proteína (%)	0,88	Potássio	237
Lípidos (%)	0,20	Cálcio	10
Fibra (%)	1,20	Fósforo	24
Hidratos de Carbono (%)	3,92	Magnésio	11
Frutose (%)	1,37	Sódio	5
Glucose (%)	1,25	Ferro	0,27
<b>Vitaminas</b>			
C (mg / 100 g)	12,70		
Tiamina (mg / 100 g)	0,037		
Riboflavina (mg / 100 g)	0,019		
Niacina (mg / 100 g)	0,594		
B6 (mg / 100 g)	0,080		
E ( $\alpha$ - tocoferol) (mg / 100 g)	0,54		
A (IU) <sup>1</sup>	833		

<sup>1</sup> 1 IU = 0,3  $\mu$ g retinol = 0,6  $\mu$ g beta-caroteno = 1,2  $\mu$ g outros carotenoides

Cerca de 72 – 92% dos pigmentos presentes no tomate encontram-se na fracção insolúvel em água e na película do tomate (Shi *et al.*, 2007). A fibra representa um dos principais constituintes da parede celular do tomate. Esta faz parte da fracção insolúvel em água e pode classificar-se em celulose, hemicelulose, substâncias pécticas e lenhina, de acordo com as suas propriedades e estrutura química. Estes polímeros têm uma grande resistência física (o que contribui para a forma e estrutura da planta), e à hidrólise química e enzimática (Gidenne *et al.*, 2006).

As substâncias pécticas são um grupo complexo de polissacarídeos carregados negativamente e acidificados que se dispõe no espaço intercelular sob a forma de pectato de cálcio ou pectato de magnésio (Pereira, 2005). Estes polissacarídeos são constituídos por uma cadeia principal linear de ácidos galacturónico em ligação  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), com alguns grupos carboxilo esterificados com grupos metilo. A linearidade da cadeia é interrompida aleatoriamente por uma molécula de ramnose, à qual se ligam várias cadeias laterais

(Barros, 2008). A American Chemical Society classificou e definiu as substâncias pécticas da seguinte forma:

- Protopectina - substância péctica insolúvel em água que, em condições de hidrólise restrita, produzem pectina ou ácidos pécticos. Esta substância péctica confere estrutura rígida aos frutos.
- Ácido péctico - é o polímero de ácido galacturónico que contém uma quantidade negligenciável de grupos metilo esterificados. Os sais destes ácidos denominam-se pectatos.
- Ácido pectínico - termo usado para designar o ácido poligalacturónico coloidal que contém uma quantidade significativa de grupos metilo esterificados (> 0 e <75%). Os sais destes ácidos denominam-se pectinatos.
- Pectina - material polimérico no qual, pelo menos 75% dos grupos carboxilo do ácido galacturónico são esterificados com metanol. Confere rigidez à parede celular quando está ligado à celulose.

As substâncias pécticas ocupam sobretudo a camada que compreende a lamela média e a parede celular primária dos tecidos e são largamente responsáveis pela rigidez dos tecidos, aumentando a estabilidade do complexo e limitando a sua vulnerabilidade ao ataque por enzimas pectinólíticas (Pereira, 2005).

A celulose apresenta uma estrutura primária baseada em ligações  $\beta$  – (1,4) não ramificadas de D-glucose. Cada dissacárido de D-glucose forma uma molécula de celobiose (Taiz e Zeiger, 2006). A sua estrutura tridimensional (planar) é mais complexa, dado que toda a D-glucose é torcida a 180° em relação à próxima molécula e as cadeias de celulose ligam-se entre si, por pontes de hidrogénio (McDougall *et al.*, 1996). Formam assim o “esqueleto” da parede celular, as microfibrilhas de celulose, que são estruturas cristalinas insolúveis, mecanicamente fortes e resistentes aos ataques enzimáticos (Ha *et al.*, 2000; Cosgrove, 2005). Julga-se existir um arranjo diferente da celulose cristalina entre as paredes celulares primária e secundária, já que nesta última está intimamente ligada à lenhina (Ha *et al.*, 2000), diminuindo assim a sua digestibilidade, enquanto que na parede primária a celulose é mais amorfa (McDougall *et al.*, 1996). Segundo Southgate e Englyst (1985), apesar de todas as formas de celulose serem aparentemente iguais existem aspectos das suas propriedades físicas, como o comprimento da cadeia ou a presença de regiões amorfas na estrutura cristalina, que a podem tornar mais susceptível aos ataques ácidos e enzimáticos.

As hemiceluloses ligam-se facilmente à celulose, por pontes de hidrogénio, formando com ela uma rede forte (Cosgrove, 2005), podendo igualmente ligar-se a outros componentes da matriz, como a lenhina ou as pectinas (Pais e Barroso, 2005). A sua

constituição é complexa pois é formada por oses neutras (xilose, arabinose, manose, glucose e fucose) e ácidas (ácido galacturónico e 4-O-metilglucorónico) com um grau de polimerização e cadeias laterais variáveis.

A lenhina é um polímero fenilpropanóico formado pela polimerização de três álcoois: p- cumarílico, coniferílico e sinapílico (Taiz e Zieger, 1998). Pode ser descrita como uma rede tridimensional ramificada e complexa, com um peso molecular elevado (Gidenne *et al.*, 2006). Forma uma barreira física que impede a aderência das bactérias às paredes celulares, dificultando a degradação bioquímica dos polissacáridos das fibras alimentares aos quais está intrinsecamente ligada, e protegendo a parede vegetal de agressões físicas (De Vries, 2003). Como tal, a quantidade de lenhina presente afecta a biodisponibilidade da celulose e hemiceluloses, diminuindo o valor nutritivo do material vegetal (Pond *et al.*, 2005).

## 2. Derivados e Subprodutos do Tomate – Concentrado de Tomate

A indústria de transformação de tomate é a principal e a mais competitiva produção horto industrial em Portugal (INE, 2008). A qualidade da produção nacional, fruto das excelentes condições edafo-climáticas, aliada à total mecanização do processo e ao incremento da dimensão das explorações daí decorrente, contribuíram para o desenvolvimento do sector (INE, 2008).

O concentrado de tomate é o principal produto elaborado nas indústrias portuguesas de transformação, tendo sido processados cerca de 1100000 toneladas de tomate por ano, só durante as campanhas 2007 e 2008, (INE, 2008; Roca, 2009). Cerca de 5% deste tomate resulta em subproduto, repiso, sendo constituído basicamente por sementes e películas, podendo ainda apresentar uma pequena percentagem de polpa.

Quimicamente, o repiso de tomate, é composto (em base seca) por cerca de 59% de fibra, 26% de açúcares totais, 19% de proteína, 8% de pectinas, 6% de gordura total e 4% de minerais (Del Valle *et al.*, 2006). Este material é também rico em água (75%) o que o torna mais propenso à degradação microbiológica e limita a duração do seu tempo de armazenamento. Frequentemente, o repiso de tomate é seco, no entanto o custo da secagem deste material aumenta significativamente o seu preço, o que faz com que maior parte do repiso seja descartado ou utilizado para a alimentação animal. O interesse da indústria da alimentação animal por este subproduto deve-se essencialmente ao elevado valor protéico, aproximadamente 20% (Ibrahim e Alwash, 1983). Contudo, o facto do repiso ter na sua constituição uma percentagem considerável de película de tomate, faz deste uma importante fonte de licopeno e da sua extracção uma boa alternativa para a valorização deste subproduto.

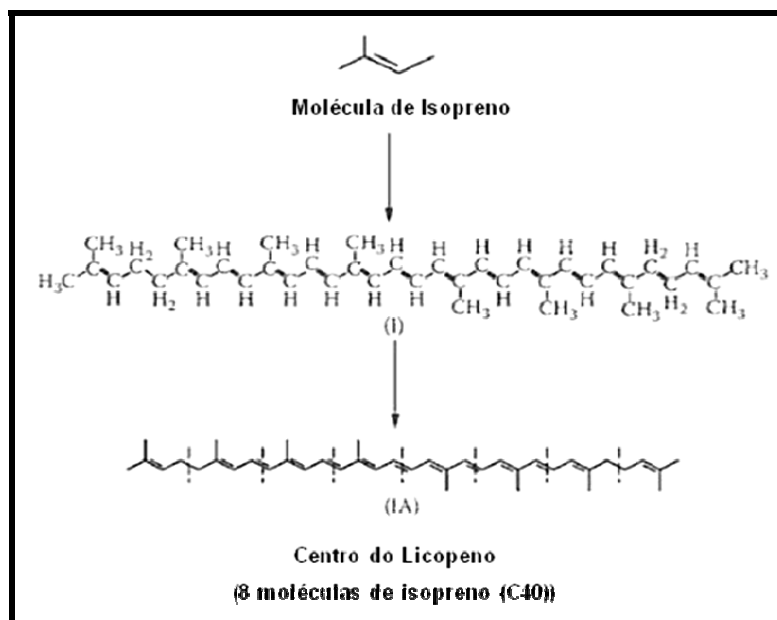
### 3. Carotenóides

#### 3.1. Características Físico – Químicas

Os carotenóides são pigmentos naturais que compreendem uma numerosa família de compostos químicos lipofílicos de cor laranja, vermelha e amarela.

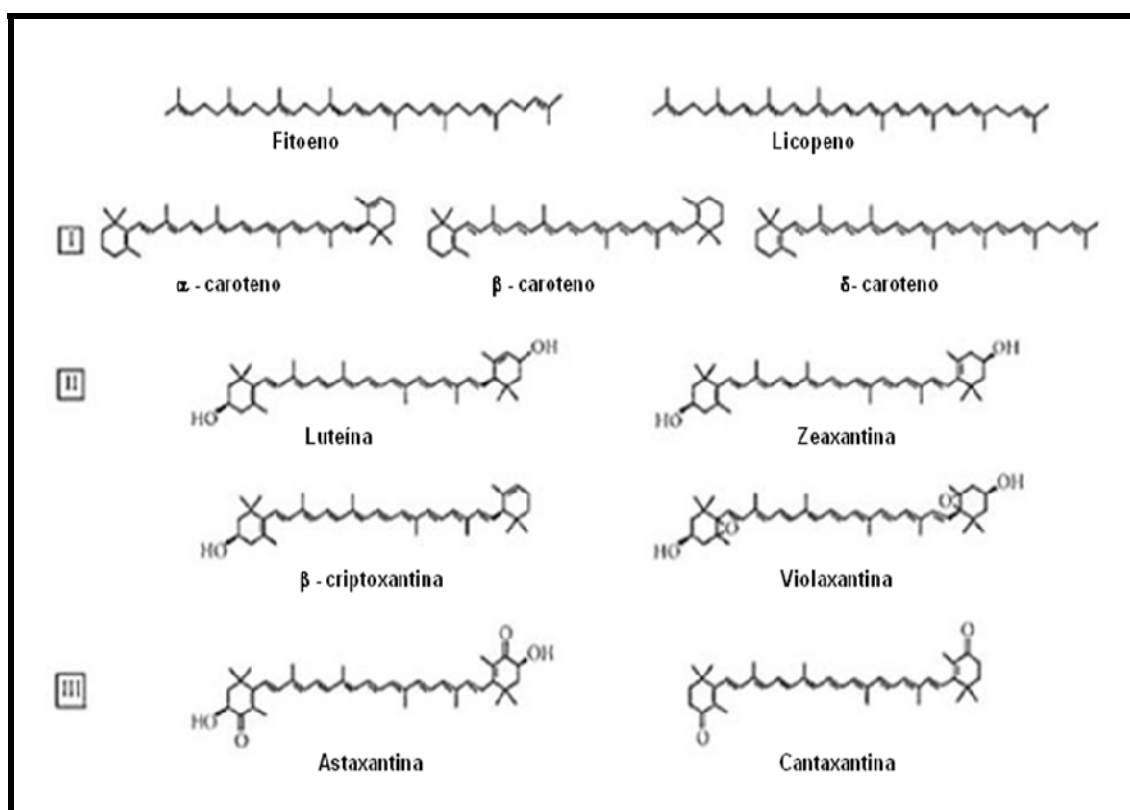
Formam-se pela união de oito unidades de isoprenóides (ou isoprenos), a que corresponde uma cadeia poli-olefínica com 40 átomos de carbono (são tetraterpenos) (**Figura 3**). Esta cadeia é, em geral, linear (acíclica) embora alguns carotenóides possuam nos extremos anéis de seis carbonos numa ou em ambas ( $\beta$  - caroteno) as extremidades. As duplas ligações presentes na molécula são conjugadas e quase sempre *trans*, e são responsáveis pela absorção de luz cujos comprimentos de onda se situam na região do visível (cromóforo). São necessárias, pelo menos, sete ligações duplas no sistema conjugado para ter impacto na cor e a extensão do sistema conjugado origina uma cor mais intensa (Belitz *et al.*, 2009 e MacDougall, 2002).

Actualmente, conhecem-se mais de 600 carotenóides naturais, que podem ser considerados derivados da estrutura acíclica do licopeno  $C_{40}H_{56}$ , por modificações como hidrogenação, desidrogenação, ciclização, inserção do átomo de oxigénio, migração de ligações duplas, migração de grupos metilo, alongamento ou encurtamento de cadeias e isomerização (Shi *et al.*, 2002; Ötles e Çagindi, 2008; Belitz *et al.*, 2009).



**Figura 3** – Estrutura molecular dos carotenóides (Fonte: Adaptado de Ötles e Çagindi, 2008).

Os carotenóides podem ser divididos em dois grupos: os carotenos, que contêm apenas átomos de carbono e de hidrogênio, o que origina moléculas de baixa polaridade, e as xantófilas, que são derivados oxigenados, uma vez que têm pelo menos um átomo de oxigênio na sua estrutura (MacDougall, 2002). Os substituintes de oxigênio mais comuns são os grupos hidroxilo (como no  $\beta$  - criptoxantina), epóxido (como na violaxantina), cetona (como na cantaxantina) e aldeído (como no  $\beta$  - citraurina) (Ötles e Çagindi, 2008). O licopeno e outros carotenos, como o  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\xi$ - caroteno apresentam uma cor que varia entre cor-de-laranja e vermelho (**Figura 4**) (Shi *et al.*, 2002). As xantófilas, como a luteína, zeaxantina e o  $\beta$  - criptoxantina imprimem as cores amarelo e castanho às folhas do Outono (**Figura 4**) (Shi *et al.*, 2002).



**Figura 4** – Estrutura molecular de alguns dos carotenóides mais comuns (I. Carotenos. II. Xantófilas. III. Carotenóides que ocorrem nos animais) (Fonte: Adaptado de Ötles e Çagindi, 2008).

A natureza apolar dos carotenóides faz com que estes sejam insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, nomeadamente acetona, éter de petróleo e álcool.

### 3.2. Distribuição na Natureza

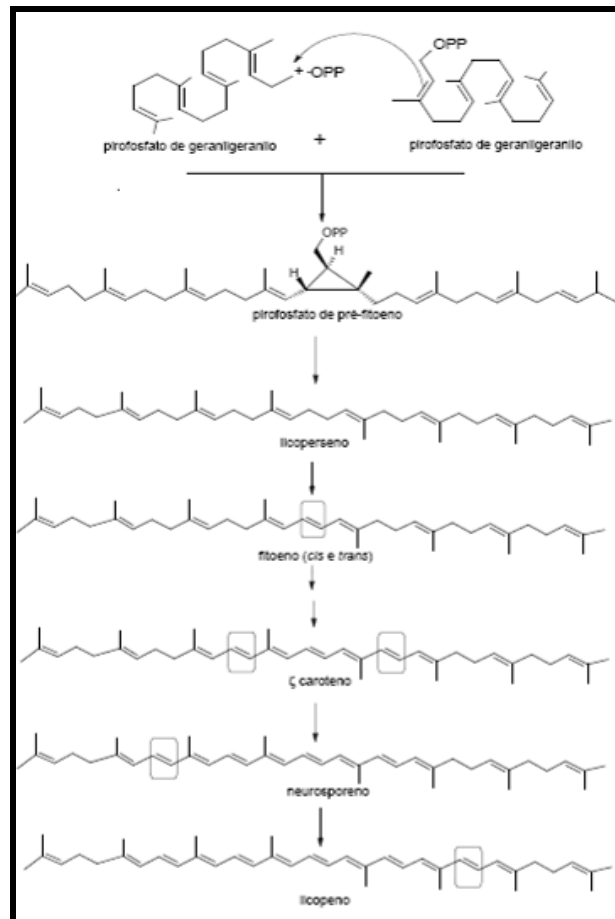
Os carotenóides encontram – se amplamente distribuídos na Natureza, estando presentes nas plantas superiores (folhas, flores e frutos) e noutros organismos, como algumas algas, alguns tipos de fungos e algumas bactérias. Ocorrem também em animais, sobretudo aves, peixes e invertebrados (Shi *et al.*, 2002). Contudo, apenas os microrganismos e as plantas são capazes de sintetizar carotenóides de novo. Os carotenóides que existem nos animais são provenientes de uma das duas fontes anteriores, por ingestão, eventual modificação ao longo do seu metabolismo e posterior acumulação em certos tecidos, nomeadamente, nas penas de flamingos, na gema de ovo ou no exoesqueleto de invertebrados (Schieber e Carle, 2005; Antunes, 2007).

Nas plantas, os carotenóides estão localizados nos plastídeos, ou seja nos cloroplastos e cromoplastos. Nos cloroplastos, estes pigmentos encontram-se sob a forma de complexo clorofila – carotenóide – proteína e a sua cor característica encontra-se mascarada pela cor verde conferida pelas clorofilas. Nos cromoplastos, os carotenóides estão depositados, podendo ocorrer sob a forma de cristais (como na cenoura e tomate) ou dissolvidos em gotículas de óleo (como no piri-piri e manga) (Schieber e Carle, 2005).

### 3.3. Biossíntese

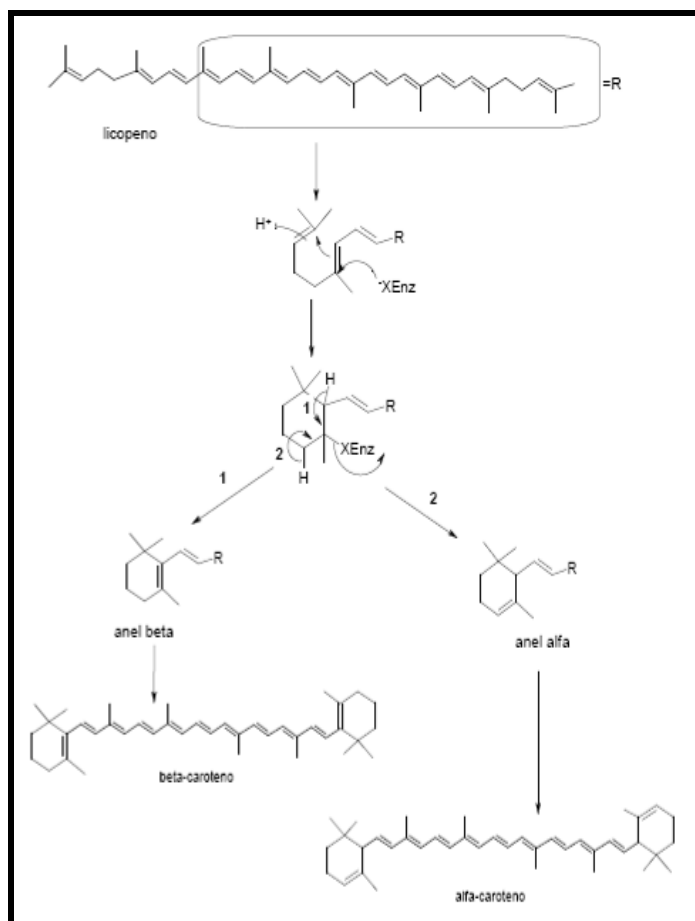
A via biossintética já é conhecida e inicia-se com a condensação de duas moléculas de pirofosfato de geranilgeranilo, obtendo-se o pirofosfato de pré-fitoeno, como intermediário e o fitoeno. Ambas as reacções são catalisadas pela fitoeno sintase. A biossíntese continua com quatro reacções de dessaturação do fitoeno e consequente formação do fitoflueno, seguido do  $\zeta$ -caroteno, neurosporeno e, finalmente, licopeno (**Figura 5**).





**Figura 5** – Biossíntese do licopeno (Fonte: Adaptado de Araújo, 2009).

O licopeno, pigmento responsável pela cor vermelha do tomate pode posteriormente sofrer ciclização, promovida pela enzima licopeno ciclase, dando origem ao  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno, seguindo-se a oxidação originando as xantófilas (**Figura 6**).



**Figura 6** – Biossíntese do  $\beta$  e  $\alpha$  - caroteno (Fonte: Adaptado de Araújo, 2009).

Ao contrário de alguns carotenóides, como o  $\beta$  - caroteno, o licopeno não possui actividade de pró-vitamina A, por não apresentar a estrutura  $\beta$ -ionona (Arab e Steck, 2000).

### 3.4. Funções biológicas

#### 3.4.1. Nas plantas

Os carotenóides têm como função primária funcionarem como pigmentos acessórios na captação de luz aquando a fotossíntese, por ampliação da faixa do espectro de luz utilizável nesta. Também actuam como fotoprotectores contra danos oxidativos sobre as moléculas de clorofila e as membranas dos tilacóides. Nas membranas dos tilacóides, os carotenóides estão ligados a clorofilas e proteínas, formando complexos específicos, designados por fotossistema I e II (PSI e PSII, respectivamente), que desempenham funções primárias na fotossíntese. O carotenóide mais abundante no PSI é o  $\beta$ -caroteno, sendo a luteína mais abundante no PSII. O ciclo da xantofila desempenha também um papel importante no mecanismo de protecção das plantas contra os danos provocados pela luz.

Estes pigmentos desempenham funções adicionais na reprodução ao conferirem cor a certos órgãos das plantas superiores, como as flores e os frutos, a fim de atrair animais para a polinização e para a dispersão de sementes.

### **3.4.2. No ser humano**

Ao longo dos anos, têm sido realizados inúmeros estudos que evidenciam os benefícios dos carotenóides para o ser humano.

A mais bem estabelecida função dos carotenóides é a de pró-vitamina A. Esta está restringida a cerca de cinquenta e três carotenóides com anéis  $\beta$  nas suas extremidades, tais como o  $\beta$ -caroteno, o mais importante precursor, a zeaxantina e a  $\beta$ -criptoxantina (Antunes, 2007).

Os carotenóides provitamina A nos vegetais e nos frutos atingem a actividade de vitamina A quando são convertidos, na mucosa intestinal, em retinol. No caso, por exemplo, do  $\beta$ -caroteno, esta conversão dá-se pela clivagem desta molécula por acção da enzima  $\beta$ -caroteno-15,15'-dioxigenase, originando duas moléculas de retinal e a sua subsequente redução a retinol (vitamina A) (Antunes, 2007). A vitamina A é indispensável para o normal funcionamento do sistema imunitário, da visão, para a manutenção epitelial, segregação da mucosa, resistência a infecções e reprodução (Delgado-Vargas, Jiménez e Paredes-López, 2000).

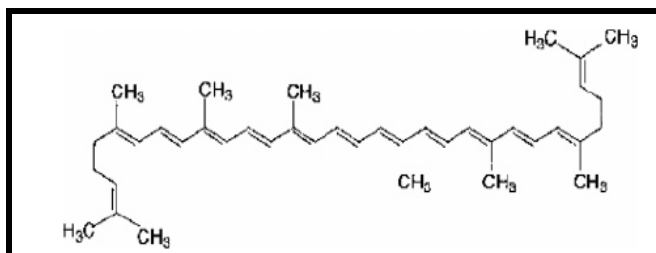
Os carotenóides, de um modo geral, apresentam elevada instabilidade quando expostos a determinados factores, como a luz, o oxigénio, os ácidos, as bases e o calor, sendo muito susceptíveis de oxidar ou isomerizar (Shi *et al.*, 2002).

Os carotenóides são dotados de actividade antioxidante, tendo aqui a sua estrutura uma forte influência. Os carotenóides têm assim a capacidade de actuar como aniquiladores do oxigénio molecular singlete, funcionando como protectores das células e dos organismos contra a foto-oxidação, evitando a presença de radicais livres e de espécies excitadas que podem causar danos irreversíveis ao nível do DNA e dos lípidos. Estas propriedades dos carotenóides fazem deles uma potencial arma contra o cancro e outras doenças que se acredita serem despontadas por radicais livres, como a aterosclerose, as cataratas, a degeneração muscular relacionada com a idade e a esclerose múltipla (Delgado-Vargas, Jiménez e Paredes-López, 2000; Antunes, 2007).

### 3.5. Licopeno

#### 3.5.1. Características Físico – Químicas

O licopeno é um carotenóide lipofílico de elevada massa molecular (536,85 Da), que se encontra sobretudo no tomate e produtos derivados, sendo responsável pela cor vermelha que estes apresentam. Caracteriza-se por possuir uma estrutura simétrica e acíclica  $C_{40}H_{56}$ , com 11 ligações covalentes duplas conjugadas e 2 ligações covalentes duplas não conjugadas. Esta estrutura é responsável pela sua cor, solubilidade em lípidos e enorme poder antioxidante (**Figura 7**) (Shi *et al.*, 2002).



**Figura 7** – Estrutura do licopeno (Topal *et al.*, 2006).

Cerca de 95% do licopeno que encontra-se nas plantas tem na forma *Trans*, uma vez que esta configuração é a mais estável em termos termodinâmicos. No entanto, quando o licopeno é exposto a determinados factores como temperaturas elevadas, luz, catalisadores ou superfícies activas, 7 das 13 ligações duplas presentes na sua estrutura isomerizam-se dando origem a moléculas com formas *Cis* e portanto menos estáveis. É o caso dos produtos transformados, em que há um predomínio da forma *Cis* devido à aplicação de calor durante a transformação. Contudo, durante o armazenamento destes produtos, ocorre, uma reversão na isomerização passando os isómeros *Cis*, menos estáveis, à sua forma mais estável, ou seja, *Trans* (Shi *et al.*, 2002).

Os isómeros *Cis* do licopeno têm propriedades químicas e físicas diferentes dos isómeros *Trans*, nomeadamente maior solubilidade em óleos e solventes hidrocarbonados. Além disso apresentam uma cor menos intensa e têm uma maior biodisponibilidade, ou seja encontram-se mais disponíveis para serem utilizados pelo organismo humano em mecanismos fisiológicos e processos metabólicos. O facto dos isómeros *Cis* serem mais facilmente absorvidos do que os isómeros *Trans* deve-se à maior solubilidade que estes isómeros apresentam em soluções lipofílicas, e ao facto de tenderem a agregar-se menos, pelo que é pouco provável encontrarem-se na forma cristalina, o que facilita o seu transporte para as células ou para a matriz do tecido (Shi *et al.*, 2002). A biodisponibilidade aumenta assim quando produtos alimentares derivados do tomate onde o isómero *Cis* do licopeno está presente são ingeridos juntamente com um óleo vegetal, pois constitui o veículo dos

mesmos. Outros estudos revelam que a ingestão de alguns tipos de fibra, como é o caso da pectina, podem reduzir a biodisponibilidade dos carotenóides (Rock e Swendseid, 1992).

### **3.5.2. Ocorrência**

Como referido, o tomate constitui a principal fonte de licopeno, representando este pigmento cerca de 80 a 90% total de carotenóides presentes neste fruto. Este carotenóide também se encontra presente, em menores concentrações, na melancia, goiaba, toranja, papaia e alperce (Shi, Maguer e Bryan, 2002)

O licopeno concentra-se sobretudo nos cromoplastos situados no epicarpo do tomate. O teor de licopeno aumenta consideravelmente durante a fase de amadurecimento do tomate, à medida que os cloroplastos existentes dão lugar a cromoplastos (Kirk e Tilney-Basset, 1978).

O teor de licopeno, bem como dos demais carotenóides, presentes no tomate fresco variam em função de inúmeros parâmetros, como variedade, factores ambientais (temperatura e luz) e práticas culturais (água, teor de nutrientes, entre outros), estado de maturação e condições ambientais durante o processo de maturação e armazenamento pós-colheita.

Sass-kiss *et al.* (2005) detectaram diferenças significativas nos teores de licopeno em tomate em dois anos sucessivos devido a condições climáticas. Num estudo conduzido por Toor *et al.* (2006) concluiu-se que temperaturas superiores a 30°C inibiam a síntese de licopeno no tomate de estufa. Já Lurie *et al.* (1996) mostraram que a biossíntese de licopeno é inibida para valores de temperatura superiores a 38°C. No que diz respeito à temperatura do solo, esta deve situar-se entre os 12 e 32°C para que a biossíntese de licopeno seja óptima. Temperaturas fora desta gama inibem a formação dos precursores do licopeno e por consequência a biossíntese do mesmo.

### **3.5.3. Efeitos para a saúde humana**

São crescentes as evidências que relacionam a ingestão de licopeno com a redução da incidência de alguns cancros e a prevenção de acidentes cardiovasculares.

Giovannucci *et al.* demonstraram uma relação inversa entre a ingestão de alimentos ricos em licopeno e a incidência de cancro da próstata. Já Ribaya-Mercado *et al.* (1995) provaram a eficiência do licopeno na protecção da pele humana perante uma situação de stress oxidativo por irradiação com raios UV. Num estudo de Goodman *et al.* (1998)

envolvendo 147 pacientes com cancro cervical e 191 indivíduos saudáveis, ficou provado que os teores de licopeno no sangue eram significativamente mais baixos nos sujeitos com cancro

Foram também efectuados diversos estudos acerca do papel do licopeno na prevenção da arteriosclerose e diversas doenças coronárias. Riso e Porrini (1997) concluíram que o licopeno actua de forma preventiva sobre os lípidos do plasma sanguíneo, protegendo-os de oxidações, reduzindo o risco de contrair arteriosclerose. Num estudo conduzido por Kohlmeir *et al.* (1997) concluiu-se que o consumo de licopeno pode reduzir o risco de desenvolver doenças cardiovasculares. Para além do efeito preventivo contra a arteriosclerose e diversos tipos de cancro, acredita-se também que o licopeno previne a oxidação do colesterol LDL.

Existem ainda alguns indícios da possibilidade de o licopeno ser capaz de estimular o sistema imunitário do ser humano actuando como base para a protecção contra o vírus HIV e síndrome de imunodeficiência adquirida (Shi *et al.*, 2002).

## **4. Metodologias de Extracção de Carotenóides**

### **4.1. Extracção Sólido / Líquido**

A extracção sólido / líquido com recurso a solventes orgânicos é um processo de separação dos constituintes duma matriz sólida, segundo a sua solubilidade num líquido usado como solvente de extracção.

A escolha do solvente de extracção exige que se tenha em consideração todos os processos envolvidos na obtenção do extracto, desde a extracção à separação e recuperação do solvente. Os solventes mais utilizados neste tipo de extracção são a acetona, o éter de petróleo, o clorofórmio e o *n* - hexano (Choksi e Joshi, 2007).

Apesar de conduzirem a rendimentos de extracção relativamente altos, os processos de extracção por solventes apresentam algumas desvantagens, nomeadamente o facto de serem poluentes, morosos e pouco selectivos. Além disso, a eliminação do solvente no final da extracção, através de processos como a destilação ou a evaporação aumenta os custos energéticos e não garante a sua remoção total.

### **4.2. Extracção por Fluidos Supercríticos**

#### **4.2.1. Introdução**

O processo de extracção com fluidos supercríticos tem vindo a despertar um interesse crescente nos últimos anos, principalmente no campo ligado à indústria alimentar. A capacidade desta metodologia cumprir as mais exigentes limitações legais, quer a nível ambiental, quer a nível das especificações dos produtos para consumo humano, aliada à crescente consciencialização por parte do consumidor dos perigos de contaminação dos alimentos, fazem da extracção com fluidos supercríticos uma excelente alternativa a metodologias convencionais de extracção com solventes.

A extracção por fluidos supercríticos apresenta várias vantagens relativamente aos processos de extracção convencionais (Lang e Wai, 2001; Silva, 2002; Shi *et al.*, 2007):

- Emprego de temperaturas de extracção baixas, minimizando as perdas de aroma, cor e valor nutricional dos produtos termolábeis;
- Possibilidade de utilização de solventes de baixa toxicidade e impacto ambiental;
- Obtenção de produtos finais livres de resíduos de solventes;
- Fácil controlo da selectividade e modificação da capacidade de penetração dos fluidos na matriz pelo ajuste da temperatura e pressão de operação;

- Fraccionamento dos extractos em diferentes produtos;
- Possibilidade de impedir a entrada de oxigénio no sistema, prevenindo as reacções de oxidação e consequente degradação do produto;
- Extracção sem riscos ambientais, pois os fluidos utilizados podem ser recolhidos e reutilizados de uma forma segura;
- Tempos de extracção curtos, quando comparados com os tempos de extracção por solventes;

Segundo Randhava e Calderone (1985) *cit. in* Silva (2002), a principal desvantagem da extracção com fluidos supercríticos é a necessidade de operar a pressões elevadas, o que obriga à utilização de instalações dispendiosas e tecnologicamente complexas. O elevado grau de complexidade do equilíbrio de fases a altas pressões, assim como a possibilidade de perda de componentes voláteis podem ser outros obstáculos ao desenvolvimento de novas aplicações para a extracção com fluidos supercríticos (Silva, 2002).

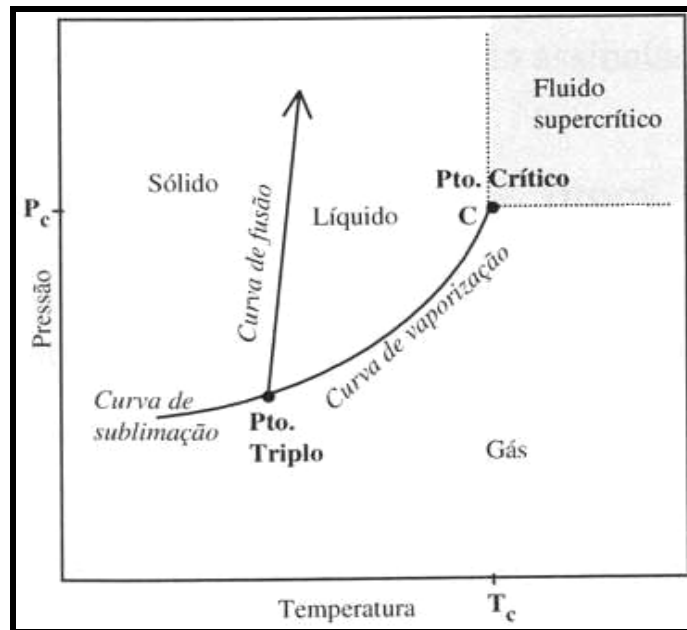
Actualmente o crescimento do processo de extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico é sustentado essencialmente por pequenos nichos de mercado, pois ainda não conseguiu o desenvolvimento indispensável para a obtenção de preços mais competitivos, no entanto, à medida que os custos de investimento diminuïrem, esta tecnologia encontrará aplicações em todas as vertentes da indústria.

#### **4.2.2. Fundamentos da Extracção por Fluidos Supercríticos**

Para compreender melhor o processo de extracção supercrítica torna-se necessário estudar as propriedades dos solventes usados nesta metodologia.

Na **Figura 8** está representado um diagrama típico de pressão *versus* temperatura para uma substância pura.





**Figura 8** – Diagrama pressão – temperatura para uma substância pura (Fonte: Silva, 2002).

Neste diagrama aparecem três regiões, correspondentes aos três estados da matéria: sólido, líquido e gasoso. O estado físico de uma substância pura depende das condições a que está sujeita, sendo possível que a substância passe de um estado físico a outro através da alteração da sua temperatura e/ou pressão. As três regiões do diagrama estão separadas por linhas que representam a coexistência de duas fases em equilíbrio: curva de sublimação (equilíbrio sólido / gás), curva de fusão (equilíbrio sólido / líquido) e curva de evaporação (equilíbrio líquido / gás). Estes diagramas evidenciam a existência de dois pontos singulares: o ponto triplo, onde convergem as três curvas de mudança de fase, e que representa o estado de equilíbrio em que coexistem simultaneamente as fases líquida, gasosa e sólida, e o ponto crítico, situado no extremo da curva de vaporização, que representa as condições de pressão e temperatura em que deixam de coexistir as fases líquida e gasosa para dar lugar a outra região distinta conhecida por zona fluída ou supercrítica. Este ponto é caracterizado por uma pressão crítica ( $P_c$ ) e uma temperatura crítica ( $T_c$ ). A temperatura crítica ( $T_c$ ) é a temperatura mais elevada a que um gás pode ser liquefeito por um aumento isotérmico da pressão, e a pressão crítica ( $P_c$ ) é a pressão mais elevada a que um líquido pode ser vaporizado por um aumento isobárico da temperatura. Quando um fluído é sujeito a condições de pressão e temperatura acima do seu ponto crítico designa-se por fluido supercrítico.

Os fluidos supercríticos apresentam propriedades físicas intermédias entre um líquido e um gás, o que os torna bons solventes de extracção. Possuem, segundo Ribeiro, Esquível e Bernardo-Gil, 2007:

- Densidade semelhante à do líquidos, o que favorece a interacção entre moléculas do solvente e do soluto e confere, portanto, maior poder solvente;
- Viscosidade próxima da dos gases, o que lhes confere boas propriedades hidrodinâmicas;
- Coeficiente de difusão intermédio o que facilita os fenómenos de transferência de massa.

O elevado coeficiente de difusão, baixa viscosidade e tensão superficial muito baixa permitem uma boa penetração na matriz, atingindo facilmente o material a extrair. A alta volatilidade facilita a remoção do solvente sem deixar resíduo no extracto (McHugh e Krukons, 1986; Cheah, Chan e Heng, 2006; Ribeiro, Esquível e Bernardo-Gil, 2007).

#### **4.2.3. O Dióxido de Carbono como Fluido Supercrítico**

Os fluidos supercríticos existentes no mercado abrangem uma vasta gama de temperaturas e pressões de operação. Contudo, de todos os solventes supercríticos, o dióxido de carbono é sem margem para dúvidas o mais utilizado, devido não só a um conjunto muito particular de características de natureza físico – química, mas também económica (Medina *et al.*, 1988). Assim, o dióxido de carbono (Martins, 1995; Trigo, 1997; Bernardo-Gil, Ribeiro e Esquível, 2002; Shi *et al.*, 2007; Roca, 2009):

- Possibilita extracções mais completas;
- Possui actividade bacteriostática;
- Permite uma eliminação fácil do solvente;
- Tem um poder solvente selectivo;
- Não é tóxico (o que o torna adequado para a indústria alimentar);
- Não cria problemas ambientais, podendo considerar-se um solvente *amigo* do ambiente;
- Está facilmente disponível no mercado a preços baixos;
- Não é inflamável nem corrosivo;
- Tem valores de temperatura e pressão críticos relativamente baixos (7,38 MPa; 31,1°C) permitindo a extracção de compostos termolábeis e diminuindo os custos de compressão do gás.

Frequentemente adiciona-se ao fluido supercrítico um co-solvente, tipicamente um composto polar de volatilidade média (metanol, etanol, acetona, entre outros) para alterar, não só o poder de solubilização do fluido supercrítico, mas também a sua selectividade

(Brunner, 1983). Com a adição de co-solventes podem ficar resíduos destes no extracto, sendo necessário um processo subsequente de eliminação dessas impurezas.

#### **4.2.4. Utilizações do CO<sub>2</sub> Supercrítico no Domínio Alimentar**

O processo de extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico tem uma gama de aplicabilidade variada na indústria alimentar. Entre as principais utilizações desta metodologia de extracção podemos encontrar:

- Descafeinação de café e chá;
- Extracção de resina de lúpulo;
- Extracção da teobromina do cacau;
- Extracção de limonina de citrinos;
- Extracção de aromas, pigmentos, antioxidantes e outras substâncias activas de várias partes das plantas (alecrim, coentros, tomilhos, entre outros);
- Fraccionamento de gorduras animais.

Contudo novas e atractivas oportunidades de aplicação desta metodologia têm surgido (Silva, 2002):

- Remoção de pesticidas de substâncias naturais, como por exemplo do ginseng;
- Obtenção de produtos de elevado valor acrescentado, como seja aditivos alimentares e nutrientes medicinais, para os quais o carácter *natural* do seu modo de processamento tem um grande valor de mercado;
- Produção de novos ingredientes alimentares;
- Eliminação de ovos de insectos, fungos, bactérias e vírus presentes frequentemente em matérias – primas de origem tropical.

#### **4.2.5. Extracção de Carotenóides por CO<sub>2</sub> Supercrítico**

A extracção de carotenóides, constitui uma das áreas de aplicabilidade do CO<sub>2</sub> supercrítico, no domínio alimentar. Esta metodologia representa uma excelente alternativa a metodologias convencionais de extracção com solventes, uma vez que o solvente utilizado permite trabalhar a temperaturas moderadas (muito vantajoso porque os carotenóides são termolábeis), não é tóxico e é facilmente separado do extracto.

Vários estudos têm sido publicados, no âmbito da extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico do licopeno, a partir do repiso de tomate. O **Quadro 2** sistematiza algumas das condições de extracção utilizadas nesses estudos, assim como os rendimentos em licopeno obtidos.

**Quadro 2** - Condições de extracção utilizadas e rendimentos em licopeno obtidos em alguns estudos de extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico de licopeno, a partir de repiso de tomate.

Material Vegetal	Temperatura (K)	Pressão (MPa)	Taxa de CO <sub>2</sub> (m <sup>3</sup> /h) ×10 <sup>3</sup>	Co-solvente	Rendimento (g / g material) ×10 <sup>6</sup>	Referência Bibliográfica
Repiso desidratado e moído	353	27,5	3		644,1	Cadoni <i>et al.</i> , 2000.
Repiso	359	34,5	0,15		4,6	Rozzi <i>et al.</i> , 2002
Repiso desidratado	373	40	0,15		1180	Topal, <i>et al.</i> , 2006
Repiso desidratado e moído	338	30	2040,8	5% de etanol	15,1	Baysal <i>et al.</i> , 2008

A solubilidade de carotenóides em fluidos supercríticos é condicionada por diversos factores, nomeadamente temperatura, pressão, caudal de CO<sub>2</sub>, presença de co-solventes, condições de conservação, tempo de extracção, teor de humidade da amostra e morfologia das partículas da amostra.

Um aumento de pressão a temperatura constante favorece o poder solvente do CO<sub>2</sub> supercrítico. Este facto constitui uma vantagem, pois permite aumentar o rendimento de extracção de carotenóides a temperaturas relativamente baixas, evitando a degradação destes. Johannsen e Brunner (1997) demonstraram que o poder solvente do CO<sub>2</sub> aumenta à medida que a sua densidade também aumenta. Este aumento de densidade permite a extracção de uma gama mais abrangente de carotenóides, dos quais se podem destacar o licopeno, o alfa-caroteno e o beta-caroteno (Shi *et al.*, 2007; Roca, 2009).

Na extracção supercrítica é muito importante conhecer a temperatura a partir da qual os compostos a extrair se começam a degradar. O licopeno, por exemplo, torna-se bastante instável a partir dos 120°C, embora a sua degradação se inicie muito antes. Deste modo não se deve aumentar muito a temperatura de extracção com o intuito de aumentar a solubilidade dos carotenóides em CO<sub>2</sub> supercrítico, pois pode levar a uma degradação dos mesmos, diminuindo o rendimento da extracção. Spanos *et al.* (1993) observaram um

aumento no rendimento da extracção de  $\beta$ -caroteno a baixas temperaturas quando efectuada a uma pressão também ela baixa (13,8MPa), pelo contrário, a pressões mais elevadas (41,4MPa) observaram que quanto mais elevada era a temperatura, maior o rendimento de extracção. Este comportamento pode ser explicado por um balanço complexo entre a densidade do  $\text{CO}_2$  e a pressão de vapor do soluto à medida que a temperatura aumenta (Shi *et al.*, 2007).

Na extracção supercrítica o caudal de  $\text{CO}_2$  também tem uma grande influência no rendimento da extracção. Quanto maior o fluxo de fluido supercrítico, maior será o rendimento da extracção. A extracção de carotenóides por este método não é excepção, quanto maior for a quantidade de  $\text{CO}_2$  consumida, maior será o rendimento obtido (Shi *et al.*, 2007).

Por se tratar de compostos muito instáveis, a concentração de carotenóides no material de origem vegetal diminui ao longo do tempo de conservação. A forma como as amostras são conservadas vai influenciar a degradação dos carotenóides. Factores como o tamanho das partículas, temperatura e humidade devem ser considerados. No caso da conservação de produtos vegetais, quanto maior o tamanho das partículas das amostras, menos degradação elas sofrem, e por conseguinte maiores rendimentos de extracção se obtêm. Outro factor a ter em conta na conservação de material vegetal para posterior extracção dos seus carotenóides é a luz. Sabe-se que a maioria dos carotenóides, incluindo o licopeno, é fotossensível, degradando-se com a exposição à luz (Shi *et al.*, 2007).

Outro parâmetro importante a otimizar no processo de extracção é o tempo de extracção. Diminuir o tempo de extracção enquanto se maximiza o rendimento é fulcral do ponto de vista de custos. Na extracção de licopeno por  $\text{CO}_2$  supercrítico, Baysal *et al.* (2000) concluíram que o rendimento máximo foi obtido entre a primeira e segunda hora de extracção. Períodos de tempo inferiores a 1 hora não permitem a total dissolução dos carotenóides no fluido supercrítico, enquanto que tempos de extracção superiores a 2 horas levam a uma maior degradação destes. O binómio tempo/temperatura está directamente relacionado com o grau de isomerização e degradação dos carotenóides, assim, torna-se muito importante reduzir ao máximo os tempos de extracção (Shi *et al.*, 2007).

Na extracção supercrítica, o tamanho e a forma das moléculas afecta os fenómenos de solubilidade, permeabilidade, difusão e resistência química. Moléculas pequenas e uniformes são ideais, pois aliam uma elevada solubilidade a uma rápida difusão (Shi *et al.*, 2007). O grau de trituração sofrido pelo material vegetal vai assim afectar a quantidade de carotenóides extraídos, pois uma maior maceração leva a um número mais elevado de paredes celulares quebradas, libertando mais pigmentos. Um estudo desenvolvido por Sun e Temelli (2006) mostra que as partículas entre os 0,25 e 0,5 mm deram origem a concentrações de luteína,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno mais elevadas.

Em material vegetal, aproximadamente 80 a 90% da sua massa total corresponde a água. A quantidade de água da amostra influencia também o rendimento de extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico. Neste sentido o processo de secagem toma um papel muito importante e deve anteceder a extracção propriamente dita. A secagem do material não deve, no entanto, ser agressiva para os compostos que se pretende extrair. Como já foi referido os carotenóides são termolábeis pelo que a secagem do material a temperaturas elevadas é de evitar. A liofilização surge assim como uma opção válida, embora mais dispendiosa.

Dada a dificuldade verificada na extracção supercrítica de carotenóides, recorre-se por vezes a outros pré-tratamentos da matéria-prima, de modo a aumentar o rendimento da mesma.

## 5. Pré tratamentos da matéria-prima - Extrusão

A extrusão é um processo HTST (High Temperature – Short Time), no qual a matéria-prima previamente condicionada é introduzida num funil de alimentação e conduzida numa única direcção e sentido ao longo de um cilindro. Durante esse percurso, o material é sujeito a temperaturas e tensões tangenciais elevadas, promovendo-se eventualmente a desnaturação da proteína e a gelatinização do amido (Harper, 1981). No momento da saída, a súbita descida de pressão provoca a evaporação da água, formando vacúolos e expandindo o material. O vapor, actuando no material ainda plástico, leva à sua expansão longitudinal e radial e a um endurecimento do mesmo em segundos, à temperatura ambiente (Silva, 2008).

A extrusão é utilizada na produção de uma grande variedade de produtos, nomeadamente snacks, cereais de pequeno-almoço, alimentos para animais domésticos, suplementos proteicos, sucedâneos de produtos cárneos, confeitaria e produtos de salsicharia.

Existem dois tipos de extrusoras, a de parafuso simples e a de duplo parafuso. Uma extrusora é constituída por várias peças que podem ser montadas e trocadas a fim de se definir uma melhor configuração para a extrusão de uma matéria-prima específica.

Entre algumas vantagens da extrusão constam (Harper, 1981):

- Alta produtividade, pois é um processo contínuo com alta capacidade de produção;
- Versatilidade, já que uma grande variedade de matérias-primas e uma escolha adequada das condições de processamento permitem obter uma grande variedade de produtos com o mesmo tipo de equipamento;
- Alta qualidade dos produtos obtidos, pois com o emprego de altas temperaturas por um curto período de tempo, minimiza a degradação de nutrientes, inibe factores antinutricionais e destrói enzimas indesejáveis;
- Protecção ambiental, porque este processo não produz nenhum resíduo e não gera poluição ambiental;
- Baixo custo

Com a utilização da extrusão como tratamento prévio do repiso de tomate pretende-se “quebrar” as paredes celulares, libertando os pigmentos e facilitando assim a extracção e aumentando a percolação do solvente.

# **DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

---



## 6. Materiais e Métodos

O presente estudo insere-se numa linha de trabalho no âmbito da valorização de subprodutos resultantes da indústria de concentrado de tomate, como fonte de carotenóides.

Atendendo a estudos anteriormente realizados por Roca (2009), que permitiram verificar que condições de pressão próximas de 200 bar são insuficientes para a extracção de carotenóides, pretendeu-se estudar o efeito de pré-tratamentos no rendimento de extracção. O pré-tratamento seleccionado foi a extrusão. Procedeu-se ainda ao estudo da implicação da redução de dimensões das partículas no rendimento de extracção.

O trabalho experimental decorreu em 2 etapas consecutivas:

1. Preparação e caracterização do material vegetal;
2. Estudo do efeito da extrusão na extracção:
  - Por CO<sub>2</sub> supercrítico;
  - Sólido / líquido por *n* – hexano.

### 6.1. Materiais

#### 6.1.1. Material Vegetal

O repiso utilizado provém da “Fomento da Indústria do Tomate S.A.” (FIT), uma das principais unidades industriais de concentrado de tomate a operar em Portugal, sediada no distrito de Setúbal. O repiso disponibilizado foi previamente acondicionado em sacos opacos de 1 kg, congelado e mantido a uma temperatura de -20°C até à sua utilização.

#### 6.1.2. Reagentes

O dióxido de carbono (pureza de 99,998%) foi fornecido pelo Air Liquide.

A acetona (p.a.), o diclorometano (HPLC grade), o acetonitrilo (HPLC grade) e o *n*-hexano (p.a) foram fornecidos pela Merck.

## 6.2. Métodos

### 6.2.1. Preparação do Material Vegetal

As amostras foram sujeitas a uma preparação antes da extracção, de modo a aumentar o rendimento da mesma. Partindo de amostras homogéneas procedeu-se à preparação do repiso para os diferentes estudos. Assim, o repiso foi liofilizado, tendo uma parte deste sido extrudido.

#### 6.2.1.1. Liofilização do Material Vegetal

O repiso a liofilizar foi previamente e criteriosamente seleccionado, de modo a remover eventuais materiais estranhos ou sem interesse para a extracção. De entre os materiais eliminados constam pedúnculos, restos de cicatrizes de pedúnculo, folhas e películas sem coloração vermelha. O repiso sujeito à triagem foi posteriormente disposto num tabuleiro e colocado na câmara de congelação do liofilizador (**Figura 9**), permanecendo na mesma durante 24 horas, até atingir temperaturas próximas de  $-40^{\circ}\text{C}$ . Passadas 24 horas, o repiso foi colocado na câmara de vácuo do liofilizador, onde se procedeu à secagem.



**Figura 9** - Câmara de congelação do liofilizador (Fonte: Roca, 2009).

### 6.2.1.2. Extrusão do Material Vegetal

A extrusão foi efectuada numa extrusora marca Brabender. Foram realizados ensaios prévios no sentido de otimizar as condições de extrusão do repiso de tomate. As variáveis consideradas foram o teor de humidade do repiso, a velocidade de alimentação, a taxa de compressão, a velocidade do parafuso e as temperaturas no cilindro (nas zonas de alimentação, amassadura e cozedura).

As condições que proporcionaram os melhores resultados foram as indicadas no **Quadro 3**.

**Quadro 3** - Condições óptimas de extrusão.

Temperatura (°C)	Velocidade do parafuso (rpm)	Taxa de compressão do parafuso	Velocidade de alimentação (rpm)	Humidade do Repiso (%)
70 – 90 - 140	220	3:1	162	20

A extrusão do repiso teve início quando as três zonas da extrusora (alimentação, compressão e cozedura) atingiram as temperaturas desejadas. O material extrudido foi, posteriormente, recolhido e colocado num frasco opaco devidamente fechado.

### 6.2.1.3. Moenda do Material Vegetal

Tanto o repiso de tomate não extrudido como o extrudido foram triturados num moinho de facas, à temperatura ambiente,

O repiso não extrudido e o repiso extrudido foram acondicionados em frascos opacos devidamente fechados, de modo a impedir a alteração da humidade das amostras e a degradação dos carotenóides por acção da luz. As amostras foram mantidas nestas condições até ao momento da extracção.

## **6.2.2. Caracterização do Material Vegetal**

### **6.2.2.1. Granulometria**

As partículas de diferentes dimensões resultantes da moenda do repiso foram classificadas granulometricamente com o auxílio de um peneiro vibratório marca Retsch e uma série de crivos com malhas progressivamente menores (mais grosseiro, no topo, e o mais fino, na base). As malhas de crivos utilizadas foram de 2 mm, 1 mm, 0,5 mm, 0,025 mm e colector.

Esta crivagem permitiu caracterizar as partículas introduzidas no extractor, no que respeita à sua dimensão.

### **6.2.2.2. Determinação do Teor de Humidade**

A humidade do repiso foi determinada por secagem em estufa a 100 – 105° C, até obtenção de peso constante. Em cada amostra foram realizadas três repetições e os resultados obtidos foram expressos em percentagem (m / m).

### **6.2.2.3. Determinação das Densidades Aparente e Real**

Na determinação da densidade aparente, mediu-se, numa proveta de vidro de 1000 ml previamente tarada, 50 ml de repiso. Posteriormente pesou-se a proveta com o repiso, de modo a determinar a massa de repiso correspondente ao volume ocupado pelo mesmo. A densidade aparente foi calculada pela razão entre a massa de repiso e o volume ocupado pelo mesmo.

Na determinação da densidade real, uma proveta de vidro de 1000 ml foi cheia com 150 ml de água destilada e tarada. Seguidamente foi-lhe adicionado repiso até à alteração do volume de água previamente contido na proveta e foi feita a leitura da massa de repiso adicionada. A densidade real foi determinada pela razão entre a massa de repiso adicionada e a variação de volume de água contida na proveta.

A determinação da densidade aparente e real foi realizada para as 3 amostras de repiso (extrudido não moído, extrudido moído e não extrudido moído) antes da extracção.

#### **6.2.2.4. Determinação das Substâncias Pécicas**

A determinação das substâncias pécicas foi realizada de acordo com a Norma Francesa V05 – 128.

As substâncias pécicas foram extraídas a partir de material insolúvel em álcool (MIA), obtido por mistura de 3 g de repiso de tomate com 15 ml de etanol a 95%, em ebulição. O conjunto foi posteriormente filtrado em vácuo, o resíduo lavado com etanol a 80% até à sua completa descoloração e seco em estufa, a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

O fraccionamento das substâncias pécicas iniciou-se com a homogeneização de 50 mg de MIA com 50 ml de água destilada. Esta mistura foi seguidamente agitada, durante 30 minutos e submetida a uma centrifugação a 5000 rpm, numa centrifugadora marca mLw T54, durante 30 minutos. O sobrenadante foi filtrado e guardado e o resíduo resuspenso em 50 ml de água destilada, agitado durante 15 minutos e centrifugado durante 30 minutos. Após a filtração do sobrenadante e a resuspensão do resíduo, repetiu-se o procedimento anterior. Os três sobrenadantes obtidos foram depois reunidos, representando este conjunto a fracção pécica solúvel em água (PS).

O resíduo resultante da etapa anterior foi resuspenso, desta vez em 50 ml de oxalato de amónio a 1% e a mistura agitada e centrifugada durante 30 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi mais uma vez filtrado e o resíduo resuspenso em mais 50 ml de oxalato de amónio a 1%, tendo-se repetido o procedimento anterior mais duas vezes, mas desta vez, com agitações de 15 minutos. Os três sobrenadantes obtidos foram reunidos, representando este conjunto a fracção pécica solúvel em oxalato (PO).

O resíduo foi resuspenso em 50 ml de ácido clorídrico e colocado durante 30 minutos por cima de um banho de água a ferver sobre refluxo, com agitação periódica. Findos os 30 minutos, o conjunto foi centrifugado a 5000 rpm durante 30 minutos. Após centrifugação, repetiu-se os procedimentos anteriores mais duas vezes (tendo-se reduzido para 15 minutos, o tempo em que o resíduo ficou por cima de um banho de água a ferver sobre refluxo) de modo a obter mais dois sobrenadantes. O conjunto dos três sobrenadantes correspondeu à fracção pécica solúvel em ácido (protopectinas) (PH).

Na determinação do ácido galacturónico, 6 ml de ácido sulfúrico concentrado foram introduzidos numa série de 4 tubos de ensaio (3 destes foram preparados em triplicado), com o auxílio de uma pipeta. Posteriormente, arrefeceu-se os tubos durante 15 minutos ao colocá-los dentro de um banho de água gelada. Acrescentou-se, a cada um dos tubos de ensaio, 1 ml das soluções obtidas na etapa do fraccionamento das substâncias pécicas, fazendo-o de modo a que as mesmas escorressem lentamente pelas paredes dos tubos, e agitaram-se os tubos. Os tubos foram depois levados a um banho de água a ferver durante

5 minutos e arrefecidos novamente no banho de água gelada durante 30 minutos. Ao fim dos 30 minutos juntou-se, a cada um dos 3 tubos de ensaio, 0,1 mL do reagente MHDP (metahidroxidifenil ou metafenilfenol), com auxílio de uma pipeta e agitou-se imediatamente cada um dos tubos. Ao 4º tubo de ensaio, que serve como testemunha, adicionou-se 0,1 ml da solução de hidróxido de sódio. Por fim agitou-se os tubos de ensaio e aguardou-se 10 minutos para que estas soluções desenvolvessem coloração. Cada uma das soluções contidas nos tubos de ensaio (3 + 1 testemunha) foi medida espectofotometricamente, num espectofotómetro de absorção marca UNICAM UV / Vis spectofotometer UV4, a 525 nm. A média obtida dos três resultados permitiu ler, sobre a curva padrão, o teor em ácido galacturónico.

#### **6.2.2.5. Fraccionamento da Fibra**

O fraccionamento da fibra de cada uma das amostras de repiso antes e depois da extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico foi efectuado segundo o método baseado no sistema detergente modificado (Robertson e Van Soest, 1981). O procedimento experimental encontra-se em anexo (**Anexo I**).

#### **6.2.2.6. Observação da Microestrutura**

Cada uma das amostras de repiso foi observada em microscópio electrónico de varrimento antes e depois a extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico.

As amostras, após fixação num porta amostras, foram cobertas com uma mistura de ouro / paladium e observadas num microscópio JEOL (Izasa, Japão), com uma voltagem de 10 KV.

### 6.2.3. Extracção de Carotenóides

#### 6.2.3.1. Extracção Sólido / Líquido por *n* - hexano

Os ensaios de extracção foram realizados à pressão atmosférica e à temperatura de ebulição do *n*-hexano (69°C) num aparelho de *Soxhlet* com uma câmara de 200 ml de capacidade. A escolha do reagente recaiu sobre o *n*-hexano devido à sua larga utilização na indústria alimentar.

Colocou-se uma determinada quantidade de repiso num cartucho de filtro de papel devidamente identificado e previamente tarado, de forma a ocupar cerca de 2/3 do seu volume, pesou-se e tapou-se a entrada do cartucho com um pouco de algodão, de modo a evitar o arrastamento de partículas aquando o processo de extracção. A amostra foi preparada em duplicado.

Introduziu-se cada cartucho, dentro do tubo de vidro do aparelho de *Soxhlet* e colocou-se cerca de 200 ml de *n*-hexano num balão de 250 ml previamente seco em estufa a 100°C, arrefecido, identificado e pesado. Montou-se o aparelho de *Soxhlet* segundo a **Figura 10**, tendo o cuidado de abrir previamente a água de circulação e garantir a existência de solvente suficiente para a extracção.



**Figura 10** - Aparelhos de *Soxhlet* em funcionamento.

Por fim, procedeu-se à recuperação do *n*-hexano, no aparelho de *Soxhlet*. O *n*-hexano residual foi removido num evaporador rotativo a 30 °C, os balões com extracto foram pesados e a massa de extracto foi determinada gravimetricamente, após remoção do solvente.

#### 6.2.3.2. Extracção por Dióxido de Carbono Supercrítico

Os ensaios de extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico foram realizados numa instalação do Instituto Superior Técnico (**Figura 11**).



**Figura 11** – Instalação supercrítica utilizada.

Na **Figura 12** encontra-se esquematizada a instalação laboratorial utilizada.



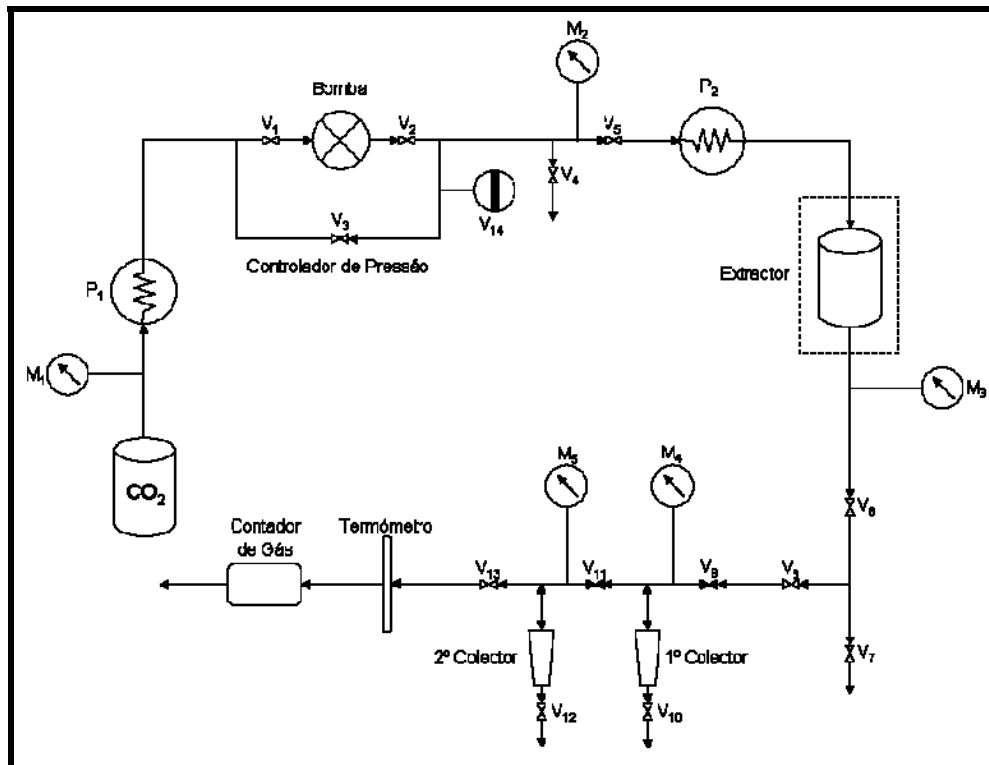
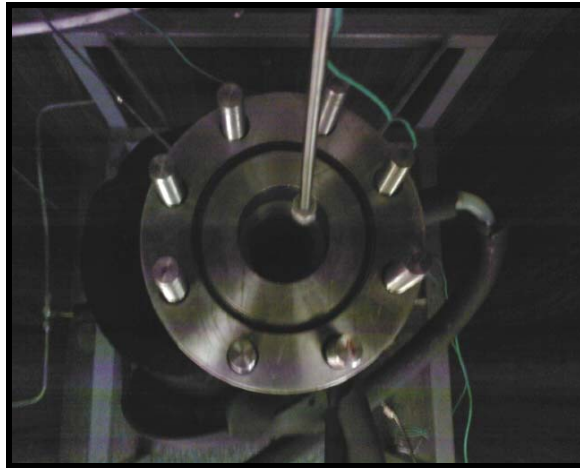


Figura 12 - Diagrama da instalação supercrítica (Fonte: Roca, 2009).

A instalação é constituída por:

- **Depósito ou Reservatório de CO<sub>2</sub>** - dotado de um prolongador, de modo a assegurar a saída do CO<sub>2</sub> no estado líquido;
- **Permutador de calor (P<sub>1</sub>);**
- **Bomba de pistão “Air Driven”** - utilizou-se uma bomba Haskel, modelo MCPV-71. A bomba funciona utilizando um pistão accionado a ar comprimido. Este pistão está em contacto com uma pequena câmara por onde passa o líquido que é comprimido. O compressor utilizado para o fornecimento de ar à bomba é um Atlas Copco LXS 111.
- **Permutador de calor (P<sub>2</sub>);**
- **Extractor de 0,5 dm<sup>3</sup>** - formado pelo corpo do extractor e por uma tampa circular, onde encaixam 8 parafusos situados geometricamente em toda a volta. O corpo do extractor tem um diâmetro de 120 mm, uma espessura de 35 mm e uma altura de 403 mm. Entre a tampa e o corpo do extractor colocou-se um anel de borracha para garantir a estanquicidade do sistema. Uma vez que o extractor se encontra fixo, o repiso é colocado primeiramente num cilindro com 27 mm de comprimento, 45 mm de diâmetro interno e 2,1mm de espessura. A base do cilindro é fechada com uma rede metálica e o topo com uma tampa de aço inox. O cilindro contendo o repiso é, então,

colocado dentro do corpo do extractor e a tampa é apertada com a ajuda de uma chave-inglesa. Nas **Figuras 13 e 14** pode observar-se o corpo do extractor sem e com a tampa apertada.



**Figura 13** – Corpo do extractor sem tampa.



**Figura 14** – Extractor fechado.

- **Zona de recolha dos extractos** - Constituída por dois colectores, três válvulas de expansão ( $V_8$ ,  $V_9$  e  $V_{11}$ ) e um banho de água com cabeça de aquecimento (**Figura 15**). As válvulas  $V_9$  e  $V_{11}$  são válvulas de agulha em aço inox modelo 2215G4Y da Hoke e controlam a pressão no primeiro e segundo colector, respectivamente. Ambos os colectores são idênticos, constituídos por um tubo de aço inox em espiral, formando um cone invertido.



**Figura 15** - Zona de recolha dos extractos.

- Rotâmetro;
- Medidor de gás.

No **Quadro 4** estão dispostas as condições de extracção que se mantiveram constantes. As condições de pressão e temperatura foram escolhidas em função da natureza dos compostos a extrair e com base na bibliografia.

**Quadro 4** - Condições de extracção supercrítica mantidas constantes.

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Ciclone 1		Ciclone 2		Velocidade Superficial do CO <sub>2</sub> (m.s <sup>-1</sup> )
		Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	
220	45	80	15	10	15	≈ 2,0 x 10 <sup>-4</sup>

Antes de iniciar cada ensaio procedeu-se à limpeza da instalação e verificação de fugas existentes. As tubagens desde a saída do extractor até à zona de recolha foram lavadas com acetona. Este solvente foi deixado em contacto com as paredes das tubagens durante 10 minutos e depois retirado por sucção através da ligação à rede de vácuo. Depois de efectuada esta lavagem seguiu-se uma extracção em branco, ou seja com o extractor vazio. Fez-se passar o CO<sub>2</sub> a alta pressão por toda a instalação durante 2 horas com a finalidade de remover quaisquer resíduos presentes no interior do equipamento.

Com a instalação devidamente limpa, as amostras foram introduzidas no cilindro do extractor. Na base e no topo do cilindro do extractor introduziu-se também malha de aço e

um disco de algodão com 3 mm de espessura. A malha de aço e o disco de algodão têm a finalidade de evitar o arrastamento de partículas para as tubagens.

Seguidamente colocou-se o cilindro, já com a matriz vegetal inclusa, dentro do corpo do extractor e apertou-se bem a tampa de aço. Antes de se iniciar a pressurização do sistema, certificou-se que o banho frio ( $P_1$ ) e o banho quente ( $P_2$ ) se encontravam à temperatura desejada. A temperatura ideal para  $P_1$  é de  $0^\circ\text{C}$ , enquanto que a de  $P_2$  pode variar entre os  $40^\circ\text{C}$  e os  $75^\circ\text{C}$  consoante a temperatura desejada na extracção a efectuar.

A pressurização do sistema iniciou-se pela abertura suave da garrafa de  $\text{CO}_2$ , fazendo com que este passe até ao extractor, elevando a pressão do sistema até à pressão da garrafa, ou seja 5 MPa. Atingida esta pressão, abriu-se lentamente a válvula de ar comprimido  $V_3$  accionando a bomba de pistão, o que elevou a pressão até aos valores desejados, ou seja, 22 MPa ( $M_2$  e  $M_3$ ). Após sair do depósito, à pressão de aproximadamente 5 MPa, o dióxido de carbono passa por um permutador de calor tubular ( $P_1$ ) para refrigeração até temperaturas próximas de  $0^\circ\text{C}$ , com a finalidade de garantir que o  $\text{CO}_2$  está totalmente líquido à entrada da bomba. Para assegurar temperaturas desta ordem, colocou-se também gelo fundente sobre a cabeça da bomba. Seguidamente o  $\text{CO}_2$  é comprimido pela bomba de pistão “Air Driven” até à pressão de trabalho e é aquecido até à temperatura de funcionamento no permutador  $P_2$ , antes de entrar no extractor que se encontra termostatizado. Depois de atravessar a matriz sólida no extractor, o  $\text{CO}_2$  sai pelo topo contendo uma determinada quantidade de soluto dissolvido e passa pela zona de expansão e de recolha. As amostras são retiradas após cada corrida. Para cada amostra, a massa de extracto depositada nos colectores é quantificada. Depois de cada corrida, a tubagem em redor dos colectores é lavada com acetona. Os extractos obtidos são separados do solvente usando um evaporador rotativo de vácuo. A quantidade de  $\text{CO}_2$  usada em cada ensaio é determinada através de um medidor de gás.

Em condições normais consegue-se a estabilização de condições de pressão ( $M_4$  e  $M_5$ ) e caudal ao fim de alguns minutos. Um factor tido em conta durante todos os ensaios foi manter o rotâmetro sempre nos 80% estabelecidos, assegurando assim um igual volume de  $\text{CO}_2$  gasto no final de cada extracção. No final do tempo estabelecido fechou-se a válvula  $V_8$ , mantendo as válvulas  $V_9$ ,  $V_{11}$  e  $V_{13}$  abertas até escoamento total do  $\text{CO}_2$ . A garrafa de  $\text{CO}_2$  e a válvula de ar comprimido também foram fechadas. Quando os manómetros  $M_4$  e  $M_5$  indicam a pressão atmosférica e o rotâmetro se encontra nos 0% é sinal que todo o  $\text{CO}_2$  foi libertado e neste momento registou-se o valor da leitura do contador de gás. O processo de escoamento do  $\text{CO}_2$  da zona de recolha demora aproximadamente 10 minutos, tempo após o qual se iniciou a recolha dos extractos dos colectores.

A recolha dos extractos foi realizada através de lavagens sucessivas com acetona, de modo a arrastar os solutos que precipitam em cada um dos colectores. Para iniciar a

recolha dos extractos removeram-se os quatro parafusos, dois em cada colector, que cobrem os orifícios por onde se introduzirá a acetona. Seguidamente encheu-se cada colector com acetona e deixou-se repousar durante 10 minutos. Ao fim deste tempo abriram-se as válvulas  $V_{10}$  e  $V_{12}$ . A acetona contida em cada colector é recolhida em pêras de vidro escuro, arrastando consigo os carotenóides extraídos. As pêras de vidro escuro foram previamente identificadas e pesadas. O processo de lavagem repetiu-se até a acetona se encontrar incolor à saída dos colectores. Seguiu-se então a descarga total do sistema, pois devido ao facto de a válvula  $V_6$  continuar fechada, o extractor continuou à pressão de trabalho de 22MPa. As válvulas de recolha de extracto ( $V_{10}$  e  $V_{12}$ ) foram fechadas, bem como as válvulas de expansão  $V_8$ ,  $V_9$ ,  $V_{11}$  e  $V_{13}$ . Iniciou-se a despressurização total do sistema abrindo lentamente a válvulas  $V_6$  e restabelecendo os equilíbrios nas válvulas  $V_8$ ,  $V_9$ ,  $V_{11}$  e  $V_{13}$ . Como a garrafa de  $\text{CO}_2$  e a válvula de ar comprimido se encontram fechadas, o sistema começa a perder pressão, até que ao fim de 30 minutos se atinge a pressão atmosférica. O extractor foi aberto e a matriz vegetal retirada. Procedeu-se à lavagem das tubagens e do cilindro de aço com acetona e o processo reiniciou-se de modo a realizar outra extracção, desta vez com uma amostra diferente.

As pêras contendo a acetona e os carotenóides por si arrastados foram sendo evaporadas sob vácuo, num evaporador rotativo Heidolf VV2000, com banho de água quente. A temperatura do banho foi mantida a 25 / 30°C, de modo a não degradar os carotenóides do extracto. A acetona evaporada nesta operação foi reutilizada na lavagem dos colectores para outros pontos da matriz experimental. Após a evaporação total da acetona, as pêras de vidro escuro foram novamente pesadas. A diferença entre a massa das pêras mais o extracto e a massa das pêras sem o extracto dá-nos a massa de extracto obtida nos colectores, e permite fazer os cálculos do rendimento total de extracção, tendo em conta a massa de repiso que entrou no extractor. Para calcular o rendimento de extracção de cada constituinte do extracto, nomeadamente licopeno, foi necessário realizar uma análise por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

#### **6.2.4. Análise dos Extractos por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)**

Os extractos obtidos em ambas extracções foram dissolvidos sob ultra-sonicação numa solução de diclorometano / acetonitrilo 1:1 (v/v) e a solução resultante pipetada para um frasco de 5 ml. Os frascos foram posteriormente fechados de modo a evitar perdas, devidamente identificados e guardados no congelador até a análise por HPLC.

A análise por HPLC foi antecedida pela filtração dos extractos em filtro de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . Seguiu-se a injeção de 20  $\mu\text{L}$  de extracto filtrado numa coluna com fase móvel constituída por diclorometano e acetonitrilo. Foram efectuadas corridas de meia hora para cada extracto e no fim comparados os resultados com cromatogramas de substâncias padrão que se pretendiam estudar. As leituras para o licopeno foram efectuadas a 475 nm, enquanto, para o  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ - caroteno, utilizou-se um comprimento de onda de 440 nm.

## 7. Resultados e Discussão

### 7.1. Caracterização do Material Biológico

#### 7.1.1. Determinação da Granulometria

A granulometria do material a ser utilizado na extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico é determinante no rendimento de extracção. Quanto menor for a dimensão das partículas mais fácil será a extracção. No entanto, partículas muito pequenas podem tornar difícil o processo devido a fenómenos de compactação que podem levar à formação de canais preferenciais, limitando o contacto homogéneo do solvente com o material biológico. É então importante encontrar equilíbrio entre estas duas variáveis.

Nas **Figuras 16, 17 e 18** estão representados os histogramas resultantes da operação de classificação a que o repiso utilizado nos ensaios de extracção foi submetido. De referir que todo o repiso utilizado no presente estudo foi liofilizado, tendo parte deste sido extrudido. As diferentes amostras serão classificadas como:

- **Repiso extrudido não moído** - repiso desidratado por liofilização.
- **Repiso não extrudido moído** - repiso desidratado por liofilização e posteriormente triturado.
- **Repiso extrudido moído** - repiso desidratado por liofilização e posteriormente extrudido e triturado.

A análise conjunta das figuras permite concluir que a extrusão não exerce qualquer influência na granulometria do repiso. O repiso que apenas foi submetido à extrusão apresenta uma grande heterogeneidade, com cerca de 65% das partículas com diâmetros compreendidos entre 0,5 e 2 mm.

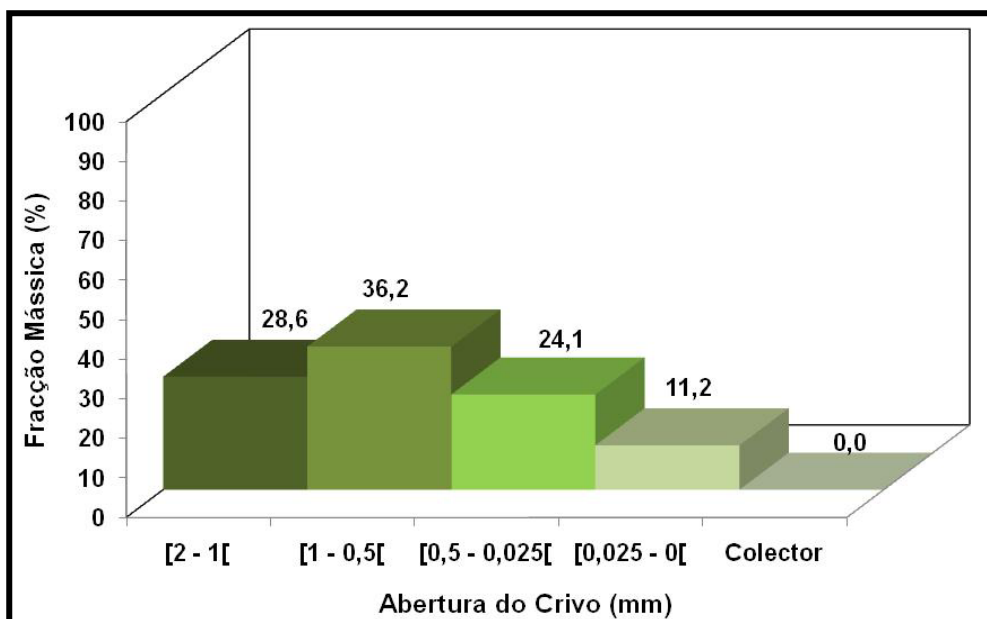


Figura 16 – Histograma do repiso extrudido não moído.

Quando se procede à operação de moenda, em todas as amostras, observa-se uma maior homogeneidade quanto aos diâmetros das partículas. No repiso não extrudido, cerca de 55% das partículas apresentam um diâmetro inferior a 0,025 mm, e cerca de 43% entre os 0,025 mm (exclusive) e os 0,5 mm. No repiso extrudido, aproximadamente 50% das partículas que constituem a mistura têm um diâmetro inferior a 0,025 mm.

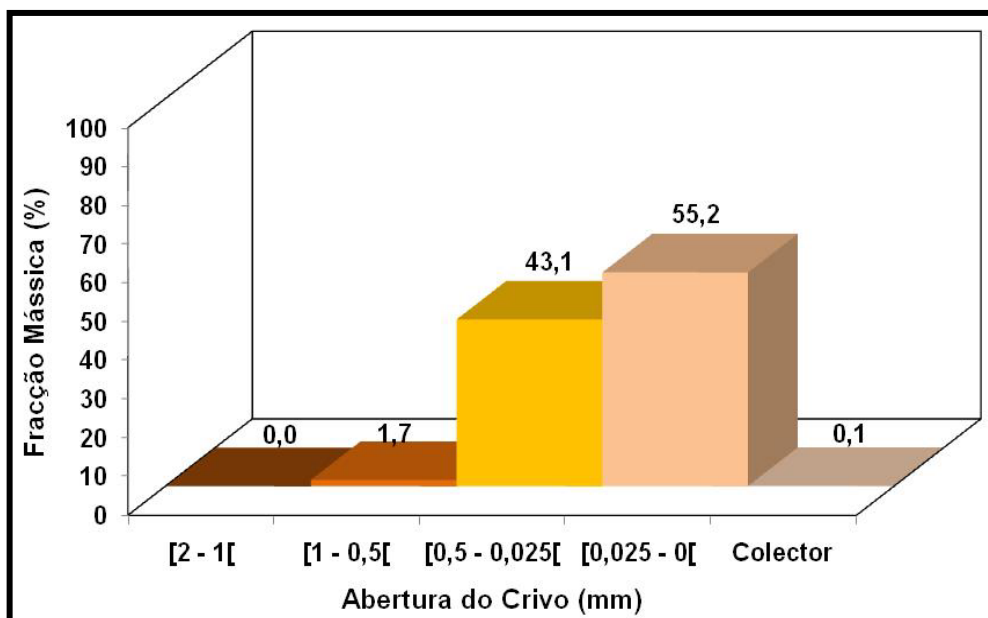
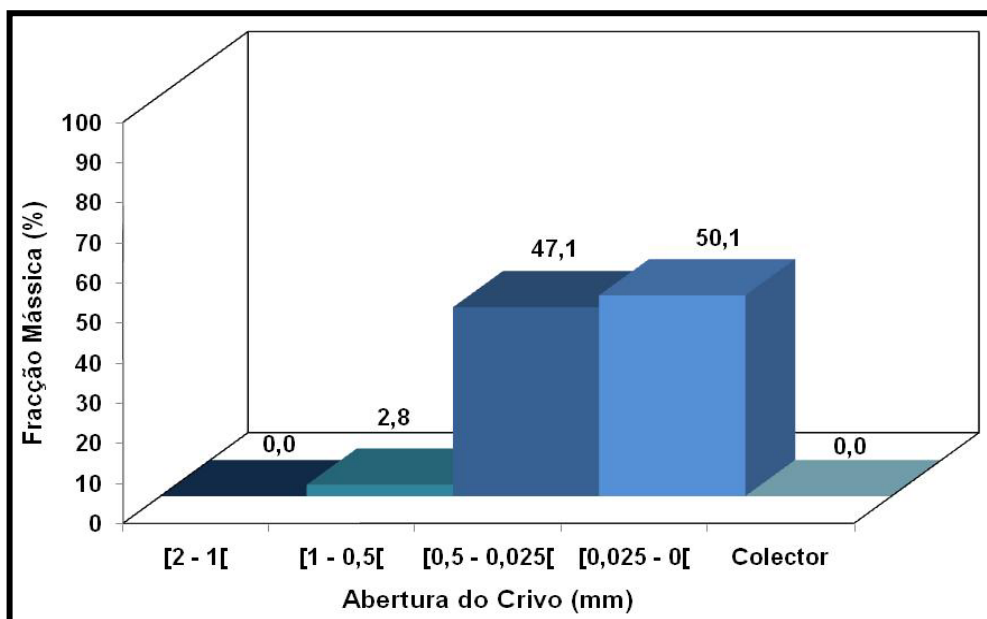


Figura 17 – Histograma do repiso não extrudido moído.





**Figura 18** – Histograma do repiso extrudido moído.

### 7.1.2. Determinação das Densidades Aparente e Real

No **Quadro 5** apresentam-se os valores de densidade aparente e real obtidos para as diferentes amostras de repiso.

**Quadro 5** - Densidade aparente e real do repiso extrudido não moído, não extrudido moído e extrudido moído.

	Extrudido Não Moído	Não Extrudido Moído	Extrudido Moído
Densidade Aparente ( $\text{Kg.m}^{-3}$ )	485	273	402
Densidade Real ( $\text{Kg.m}^{-3}$ )	4517	4850	4050

Por observação do **Quadro 5** verifica-se que a amostra de repiso extrudido e não moído apresenta uma maior densidade aparente. Tal era de prever, uma vez que esta amostra é a que apresenta uma maior heterogeneidade entre as partículas que a constituem, originando mais espaços de maior volume, e contém partículas de maior dimensão, 65% dos quais compreendidos entre 0,5 e 2 mm. Ou seja, o volume ocupado pelas partículas e pelos espaços entre elas é maior. O repiso não extrudido moído é o que apresenta uma menor densidade aparente, quando comparado com as restantes amostras. Este facto presume que existem poucos espaços entre as partículas que constituem a amostra devido a uma maior homogeneidade quanto à dimensão e forma destas. Ou seja, o

leito de extracção supercrítica constituído por esta amostra pode levar à ocorrência de fenómenos de compactação, e consequentemente a uma maior probabilidade de ocorrência de canais preferenciais por onde passa o CO<sub>2</sub> supercrítico. A ocorrência de canais preferenciais dificulta a extracção, uma vez que a área de contacto entre o CO<sub>2</sub> e a amostra é menor.

Quanto à densidade real, a amostra de repiso não extrudido moído é a que apresenta um valor maior, o que revela que existe um maior número de partículas por m<sup>3</sup> de volume de amostra. Este resultado está em conformidade com o obtido para a densidade aparente. Um menor valor de densidade real foi obtido para a amostra de repiso extrudido e moído.

Conclui-se assim que a extrusão pode ter exercido uma influência positiva na densidade aparente e real do repiso porque pode ter diminuído a probabilidade de ocorrência de fenómenos de compactação.

### **7.1.3. Determinação das Substâncias Pécicas**

Para determinar e caracterizar as substâncias pécicas que constituem as amostras de repiso procedeu-se à extracção e posterior fraccionamento das mesmas em fracção pécica solúvel em água (PS), fracção pécica solúvel em oxalato (PO) e fracção pécica solúvel em ácido (PH).

A fracção pécica solúvel em água (PS) abrange as pectinas e os ácidos pectínicos coloidais que contêm uma quantidade significativa de grupos metilo com alto grau de esterificação. A fracção pécica solúvel em oxalato (PO) inclui os ácidos pécicos e os ácidos pectínicos coloidais com uma quantidade significativa de grupos metilo com baixo grau de esterificação, e caracterizam-se por serem insolúveis em água e formarem geles ou precipitados com iões metálicos polivalentes. Podem ocorrer naturalmente em pequenas quantidades, ou podem ser sintetizados em grandes quantidades, por acção de uma enzima, a pectina metilesterase (pectinesterase), em substâncias pécicas solúveis em água. A fracção pécica solúvel em ácido (PH) é constituída por uma substância insolúvel em água, a protopectina, que em condições de hidrólise restrita (a quente, na presença de um ácido diluído) origina ácidos pectínicos. Sob condições de armazenamento longo, a hidrólise lenta deste material pode causar um aumento no teor de pectina ou ácido pectínico do produto (Ranganna, 1986).

A solubilização da fracção insolúvel em água é geralmente correlacionada com a diminuição da firmeza do tecido, facilitando assim a extracção de compostos.

O **Quadro 6** sistematiza os teores das diferentes fracções de substâncias pécicas obtidos para as amostras de repiso extruído moído e não extruído moído, antes e depois da extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico.

**Quadro 6** – Teor em ácido galacturónico (a.g) presente nas diferentes fracções de substâncias pécicas, nas amostras de repiso extruído moído e não extruído moído antes e depois da extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico, expresso em miligramas por mililitro (mg / ml).

Repiso	Antes da Extracção			Depois da Extracção		
	PS (mg / ml de a.g.)	PO (mg / ml de a.g.)	PH (mg / ml de a.g.)	PS (mg / ml de a.g.)	PO (mg / ml de a.g.)	PH (mg / ml de a.g.)
<b>Extruído</b>	17,569	28,301	6,771	14,364	46,944	8,899
<b>Moído</b>						
<b>Não Extruído</b>	6,426	29,209	15,213	9,484	21,351	15,162
<b>Moído</b>						

Ao comparar os dados obtidos para cada uma das amostras antes da extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico verifica-se que a extrusão conduziu a um aumento da fracção solúvel em água e a uma diminuição da fracção solúvel em oxalato e da fracção solúvel em ácido (protopectinas). O aumento da fracção solúvel em água pode ter resultado sobretudo da solubilização da protopectina promovida pelas altas temperaturas a que a amostra de repiso foi submetida na extrusora. Estas temperaturas altas levaram à ocorrência de uma hidrólise da protopectina com a consequente formação de pectina e ácido pectínico, solúveis em água.

Perante as condições da extracção supercrítica verificou-se um aumento da fracção solúvel em água devido à conversão da protopectina das fracções insolúveis em água em pectina ou a mudanças entre os diferentes tipos de pectinas. O referido efeito pode verificar-se por acção térmica (Yen e Lin, 1998). Esta mesma tendência foi encontrada por Ciruelos *et al.* (2001) que ao estudarem o efeito do tratamento térmico nas pectinas do tomate, concluíram que o aumento da temperatura provoca uma progressiva solubilização da pectina, ocorrendo assim um aumento da fracção pécica solúvel em água, em paralelo com um decréscimo nas fracções pécicas insolúveis (fracções solúveis em oxalato e ácido). No caso da extracção supercrítica este aumento pode dever-se ao efeito das pressões elevadas a que o repiso foi submetido. No repiso não extruído, o aumento da fracção solúvel em água deve-se sobretudo à solubilização da fracção pécica solúvel em oxalato. Na amostra

de repiso extrudido moído ocorreu uma diminuição da fracção solúvel em água e um aumento da fracção solúvel em oxalato e da fracção solúvel em ácido (protopectinas). Este facto indica que durante a extracção, podem ter sido criadas condições que conduziram à polimerização da fracção solúvel em água e conferiram assim uma maior integridade à parede celular, o que poderá dificultar a extracção dos carotenóides.

Segundo os dados obtidos conclui-se que a extrusão como pré-tratamento à extracção por CO<sub>2</sub> supercrítica não facilitou a extracção dos carotenóides,

#### **7.1.4. Fraccionamento da Fibra**

A fibra alimentar é constituída pela fracção insolúvel, da qual fazem parte a celulose, algumas hemiceluloses, algumas substâncias pécticas e a lenhina, e pela fracção solúvel que contém as pectinas, gomas, mucilagens e algumas hemiceluloses (Pourchet-Campos, 1988).

O método proposto por Van Soest (1963) que foi utilizado neste trabalho permitiu determinar os teores de fibra no detergente neutro (NDF), fibra no detergente ácido (ADF) e lenhina no detergente ácido (ADL) (**Anexo II**). A partir dos dados obtidos calculou-se os teores de hemicelulose, celulose e lenhina para as diferentes amostras de repiso. A hemicelulose foi determinada pela diferença entre o NDF e o ADF e a celulose calculou-se pela diferença entre o ADF e o ADL. O teor de lenhina correspondeu ao obtido para o ADL.

Os teores de hemicelulose, celulose e lenhina obtidos para cada amostra de repiso, antes e depois da extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico encontram-se no **Quadro 7**.

**Quadro 7** – Teores de hemicelulose, celulose e lenhina das amostras de repiso extrudido não moído, extrudido moído e não extrudido moído, antes e depois da extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico, expressos em massa húmida.

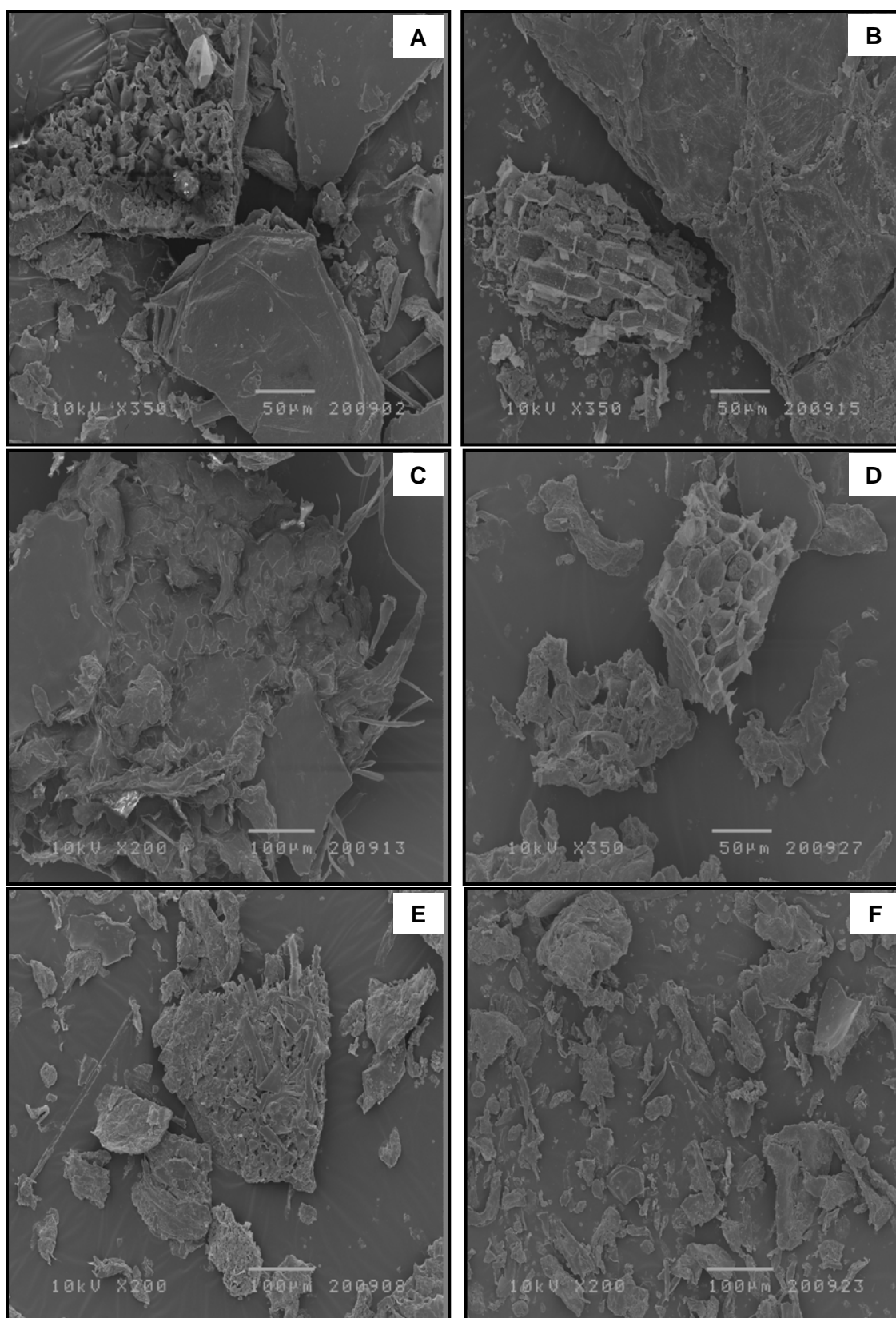
Repiso	Antes da Extracção			Depois da Extracção		
	Hemicelulose (%)	Celulose (%)	Lenhina (%)	Hemicelulose (%)	Celulose (%)	Lenhina (%)
<b>Extrudido Não Moído</b>	10	16	23	11	16	23
<b>Extrudido Moído</b>	10	15	21	11	16	20
<b>Não Extrudido Moído</b>	9	15	20	9	17	21

De acordo com os dados do **Quadro 7**, a extrusão conduziu a um aumento pouco significativo do teor em hemicelulose, celulose e lenhina. Este aumento presume que as condições que se criaram na extrusão não foram suficientes para solubilizar estes compostos, por forma a facilitar a extracção de carotenóides, uma vez que eles ficaram mais fortemente retidos na matriz vegetal. Após a extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico, os teores em hemicelulose, celulose e lenhina mantiveram-se de uma maneira geral constantes, tendo-se registado somente uma diminuição do teor em lenhina na amostra de repiso extrudido moído.

#### 7.1.5. Observação da Microestrutura

Na **Figura 19** estão representadas as fotografias obtidas por SEM (Microscopia electrónica de varrimento) das amostras de repiso não extrudido moído, extrudido não moído e extrudido moído, antes e depois da extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico. Nestas imagens não é possível diferenciar, com exactidão, as células que compõem cada uma das partículas das amostras. Contudo, pode verificar-se que as partículas diferem em cada uma das amostras quanto à forma e disposição.

Ao comparar as **Figuras 19A, 19B e 19C** concluiu-se que a extrusão provocou a fusão / aglomeração das partículas que constituíam as amostras. Esta fusão pode ter dificultado a percolação do solvente na matriz de extracção. Por observação das **Figuras 19D, 19E e 19F** constata-se que, a extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico, implicou a formação de canais de passagem do solvente na matriz.



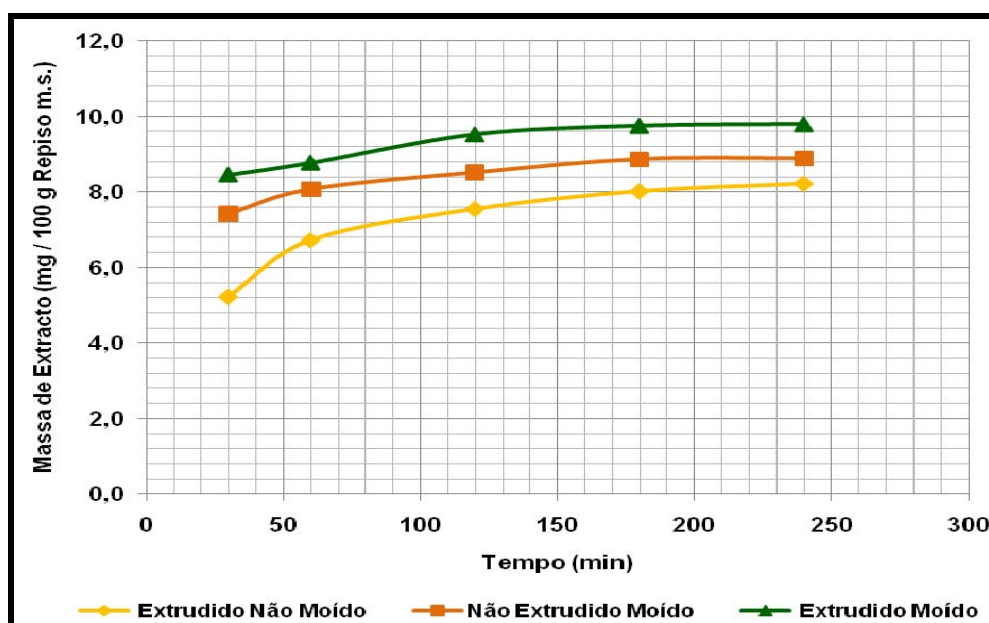
**Figura 19** – Fotografias de SEM das amostras de repiso: A – não extrudido e moído; B – não extrudido, moído e extractado por CO<sub>2</sub> Supercrítico; C – extrudido e não moído; D – extrudido, não moído e extractado por CO<sub>2</sub> Supercrítico; E - extrudido e moído; F – extrudido, moído e extractado por CO<sub>2</sub> Supercrítico.

## 7.2. Extracção de Carotenóides

### 7.2.1. Extracção Sólido / Líquido por *n* – Hexano

Com vista a poder ter um termo de comparação para o rendimento de extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico procedeu-se à extracção por solvente orgânico (*n*-hexano).

A análise da **Figura 20** permite concluir que, por *n*-hexano, a extracção se pode considerar terminada ao fim de cerca de 3 horas para as amostras com as três amostras analisadas. Observa-se que a extrusão seguida de trituração foi eficaz no aumento do rendimento total de extracção (cerca de 9,8%).



**Figura 20** - Curvas de extracção por *n* - hexano de repisos extrudido não moído, não extrudido moído e extrudido moído.

Os extractos obtidos foram analisados com o intuito de conhecer o rendimento de extracção em carotenóides. Os teores totais de licopeno,  $\alpha$  - caroteno e  $\beta$  - caroteno obtidos por extracção por *n* – hexano encontram-se sistematizados no **Quadro 8**. Tal como esperado o licopeno é o carotenóide maioritário no tomate.

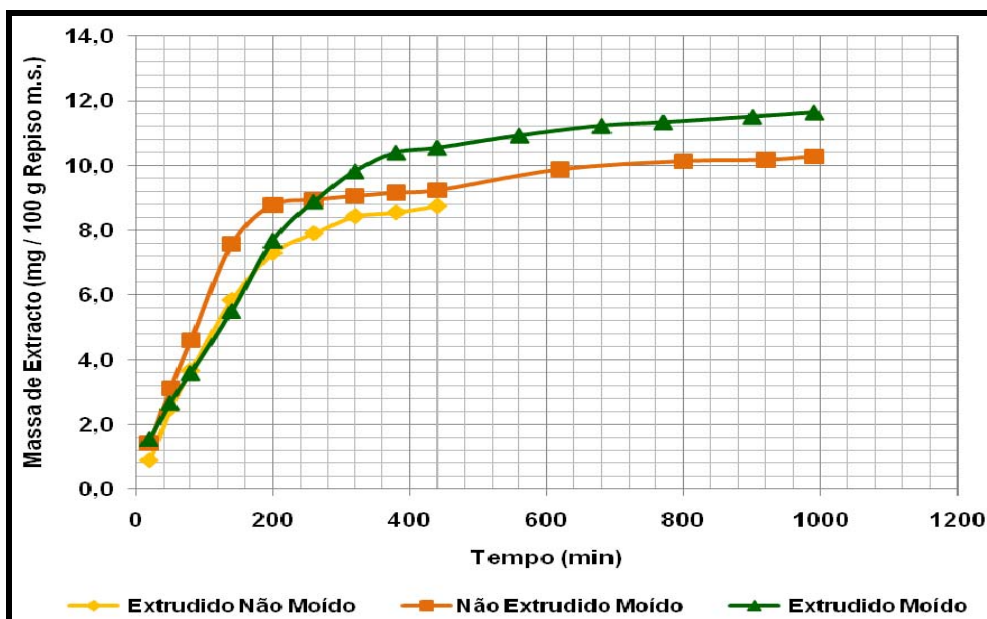
**Quadro 8** – Teores de licopeno,  $\alpha$  - caroteno e  $\beta$  - caroteno obtidos por extracção por *n* – hexano.

Repiso	Teor em Carotenóides (mg / 100 g m.s.)		
	Licopeno	$\alpha$ - caroteno	$\beta$ - caroteno
Extrudido Não Moído	25,3	2,2	0,5
Extrudido Moído	19,4	1,7	0,4
Não Extrudido Moído	23,5	1,8	0,3

### 7.2.2. Extracção por CO<sub>2</sub> Supercrítico

Na **Figura 21** apresentam-se as curvas que descrevem os rendimentos de extracção (mássicos) por CO<sub>2</sub> supercrítico para as diferentes amostras. Verifica-se que a aplicação do tratamento prévio de extrusão, seguido de moenda, conduziu a um maior rendimento total em extracto (11,6%). Esta afirmação sugere que, o facto da maioria das partículas da amostra de repiso extrudido moído terem um diâmetro inferior a 0,5 mm pode ter sido determinante para um maior rendimento total de extracção nesta amostra, uma vez que, quanto menor o tamanho das partículas da amostra, maior será a massa de extracto obtido. O grau de trituração sofrido pelo material vegetal vai afectar a quantidade de compostos extraídos, pois uma maior trituração leva a uma maior ruptura de paredes celulares, facilitando o contacto entre compostos e solvente. O processo de extrusão pode ter facilitado a libertação de compostos, uma vez que nas duas amostras de repiso com partículas de diâmetro semelhante, aquela que foi sujeita a extrusão foi a que conduziu a um maior rendimento total de extracção. No entanto, não se verificam diferenças significativas na quantidade de extracto obtido entre a amostra não extrudida e moída e amostra de repiso sujeita apenas a extrusão. Assim, apesar da granulometria desta ser muito superior, constata-se que a aglomeração devida ao pré-tratamento não impediu a percolação do solvente na matriz de extracção. De salientar que o rendimento total de extracção foi superior ao observado na extracção por *n*-hexano, o que pode significar que a extracção pelo solvente orgânico seleccionado não foi completa. No caso da extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico o equilíbrio conseguiu-se ao fim de mais 16,5 horas.





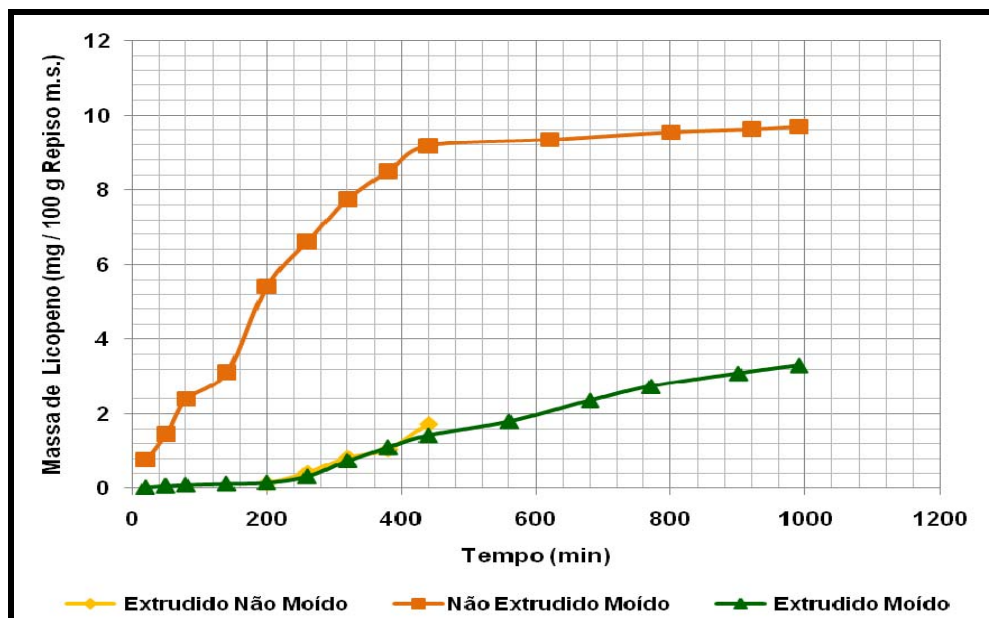
**Figura 21** - Curvas de extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico de repiso extrudido não moído, não extrudido moído e extrudido moído.

Na **Figura 22** apresentam-se as curvas que descrevem o rendimento de extracção em licopeno para as diferentes amostras. Neste caso verifica-se que o teor de licopeno é maior na amostra de repiso não extrudido e moído (9,7mg / 100g m.s.). Atendendo a que o teor total de licopeno extractado por *n*-hexano nesta amostra foi de 23,5 mg / 100g m.s. (**Quadro 7**) o rendimento de extracção do licopeno foi de 41%, em relação à extracção por *n*-hexano. A importância da redução do tamanho das partículas da amostra na quantidade de extracto obtido é conhecida, uma vez que esta aumenta a recuperação de compostos lipofílicos por ruptura nas paredes celulares e portanto amplia a área superficial de contacto com o CO<sub>2</sub> (Eggers, 1996). Nobre *et al.* (2009) verificaram que a recuperação do *trans* – licopeno tende a aumentar drasticamente com a diminuição do diâmetro das partículas que compõem a amostra (0,15 mm).

Um teor de humidade mais baixo (3%) da amostra de repiso não extrudido e moído comparativamente aos teores de humidade das restantes amostras (10% no extrudido não moído e 9% no extrudido moído) também pode ter conduzido a um teor em licopeno maior. Este facto explica-se pela maior solubilidade da água no CO<sub>2</sub> quando comparada com o *trans*-licopeno o que faz com que possa estabelecer-se na extracção alguma competição entre a água e os carotenóides (Gómez-Prieto, *et al.*, 2002; Sabirzyanov *et al.*, 2002; de la Fuente *et al.*, 2006; Topal *et al.*, 2006).

A amostra extrudida e moída conduziu a um rendimento de extracção em licopeno baixo, de apenas 17%. Ou seja, o processo de extrusão não contribuiu para aumentar significativamente o teor de licopeno extraído, o que sugere que a extrusão facilitou a

libertação de outros compostos que não o licopeno (**Figura 21**), continuando parte deste retido na matriz vegetal. Entre os compostos que possivelmente estariam presentes no extracto resultante da amostra de repiso extrudido e moído estariam outros carotenóides (Cadoni *et al.*, 2000), lípidos (Ruiz del Castillo *et al.*, 2003), tocoferóis e sitosterol (Vági *et al.*, 2007).



**Figura 22** - Curvas de extracção do licopeno obtidas na extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico dos repisos extrudido não moído, não extrudido moído e extrudido moído.

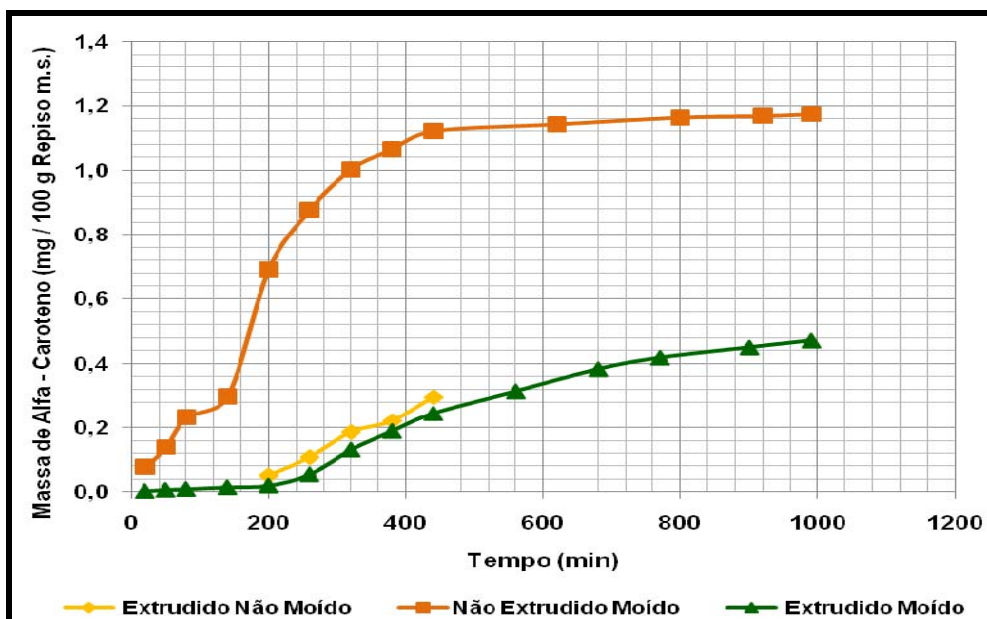
No entanto, na extracção por *n* – hexano (**Quadro 8**) obteve-se um teor em licopeno superior na amostra de repiso extrudida e não sujeita a moenda (25,3 mg / 100 g m.s.). A diferença entre esta amostra e a amostra não extrudida e moída não foi significativa (23,5 mg / 100 g m.s.).

As curvas de extracção de alfa - caroteno e de beta - caroteno apresentam um comportamento semelhante à do licopeno. Os teores de alfa - caroteno e de beta - caroteno foram superiores para a amostra de repiso não extrudido e moído (**Figuras 23 e 24**). Os rendimentos de extracção do alfa-caroteno e beta – caroteno, quando comparados com a extracção por *n*-hexano, foram elevados, respectivamente 65% e 88%, revelando que a extracção por CO<sub>2</sub> supercrítica apresenta-se como uma alternativa viável na extracção na extracção destes compostos.

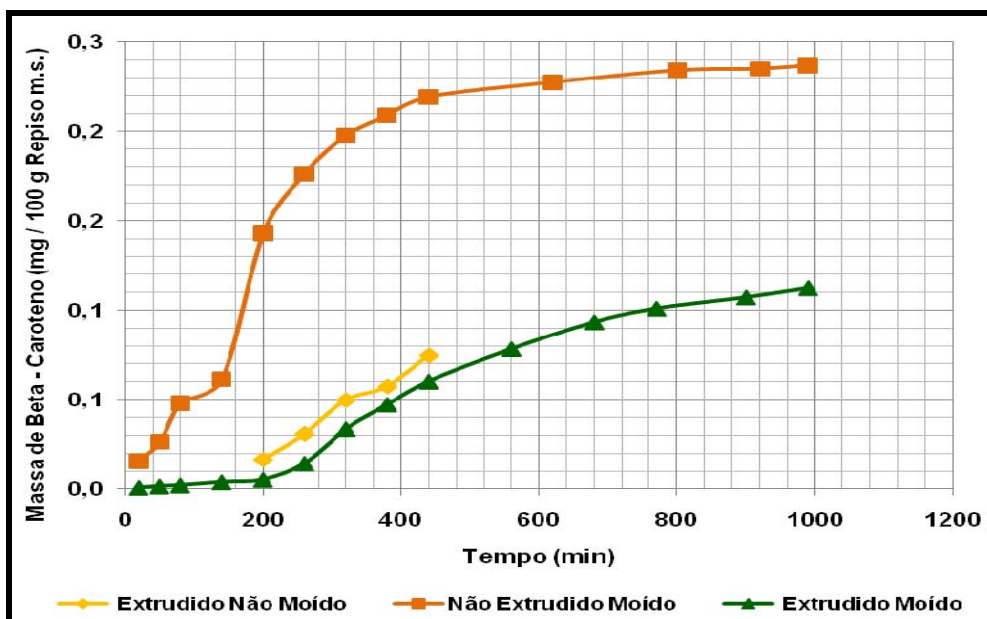
Mais uma vez reforça-se a importância do diâmetro das partículas no aumento da extracção.

A amostra de repiso extrudida e moída originou um rendimento de extracção em alfa-caroteno e beta – caroteno de 29% e 32%, respectivamente. Mais uma vez a extrusão não

se revelou um pré-tratamento eficaz, uma vez que não conduziu a teores mais elevados de alfa - caroteno e de beta - caroteno.



**Figura 23** - Curvas de extracção do alfa - caroteno obtidas na extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico dos repisos extrudido não moído, não extrudido moído e extrudido moído.



**Figura 24** - Curvas de extracção do beta - caroteno obtidas na extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico, a partir dos repisos extrudido não moído, não extrudido moído e extrudido moído.

Em suma, os rendimentos de extracção obtidos por CO<sub>2</sub> supercrítico nas condições testadas para o licopeno,  $\alpha$ - caroteno e  $\beta$ - caroteno foram inferiores aos resultantes da extracção por *n* - hexano. Estes valores podem ter sido influenciados pela pressão de trabalho baixa (22MPa) a que o equipamento estava limitado, por questões de segurança.

Um aumento da pressão resultaria num aumento da densidade do CO<sub>2</sub>, conferindo assim maior poder solvente a este fluido supercrítico, portanto, pressões altas conduziriam a recuperações em quantidade e a interações fortes entre o fluido e a matriz. Yi *et al.* (2009) observaram que um aumento da pressão de trabalho de 20 para 40MPa resultou num aumento do rendimento em licopeno. Estes resultados foram consistentes com os reportados por Topal *et al.* (2006). No entanto, estas pressões de trabalho podem inviabilizar a aplicação da técnica devido a factores económicos, visto que, os equipamentos necessários para trabalhar em segurança nesta gama de pressões, bem como os gastos energéticos associados, serão muito superiores.

O tamanho das partículas também pode ter condicionado os resultados de extracção obtidos por CO<sub>2</sub> supercrítico nas amostras moídas. Sabe-se que o uso de diâmetros muito pequenos pode constituir um problema na extracção, na medida em que vai provocar uma compactação e a consequente formação de canais no leito de extracção. Este facto foi comprovado por Sábio *et al.* (2003) que verificaram a diminuição do rendimento de extracção em licopeno em amostras de repiso com um diâmetro de partículas muito pequeno (0,08 mm). Reverchon e De Marco (2006) sugerem que o diâmetro óptimo das partículas para a extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico deve situar-se entre 0,25 mm e 2,00 mm.

Apesar de os rendimentos de extracção obtidos por CO<sub>2</sub> supercrítico para o licopeno,  $\alpha$ - caroteno e  $\beta$ - caroteno terem sido inferiores, o rendimento de operação foi muito superior porque a extrusão, ao levar a uma compactação do material vegetal, permite introduzir no extractor cerca de três vezes mais material.

## 8. Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram retirar as seguintes conclusões:

- A extrusão como tratamento do repiso de tomate prévio à extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico, não implicou melhoria da extracção dos carotenóides, uma vez que, além de não ter conduzido a uma solubilização significativa da fracção insolúvel da fibra (celulose, hemicelulose, lenhina e algumas substâncias pécicas), constituinte da parede celular, provocou ainda a fusão/aglomeração das partículas que constituíam as amostras, o que pode ter dificultado a percolação do solvente na matriz de extracção.
- Os rendimentos de extracção obtidos por CO<sub>2</sub> supercrítico para o licopeno,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ - caroteno foram inferiores aos alcançados na extracção por *n*-hexano. Estes resultados podem ter sido influenciados pela pressão de trabalho relativamente baixa (220 MPa) ou pela velocidade superficial relativamente alta.
- Do ponto de vista do rendimento da operação de extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico, a extrusão conduziu a valores muito superiores quando comparada com a extracção por *n*-hexano. O material extrudido permitiu uma maior compactação do material vegetal, pelo que foi possível introduzir no extractor cerca de três vezes mais material.
- Na extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico, a amostra de repiso não extrudido e moído foi a que conduziu a maiores teores em licopeno,  $\alpha$ - caroteno e  $\beta$ - caroteno (9,7, 1,17 e 0,24 mg / 100 g matéria seca, respectivamente) ao fim de 16,5 horas de extracção.
- A moenda como pré-tratamento conduziu a recuperações em licopeno,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ - caroteno mais elevadas, o que evidencia que partículas pequenas e uniformes são ideais, permitem uma mais fácil difusão do CO<sub>2</sub>.

De acordo com a bibliografia consultada e os resultados obtidos, a utilização do CO<sub>2</sub> supercrítico para a extracção de caronóides, sobretudo de licopeno, a partir de repiso dtomate é viável e traduz-se em teores de carotenóides significativos. No entanto, dadas as características destes compostos, sobretudo do licopeno, e a sua inclusão na matriz vegetal, são necessários estudos suplementares da extrusão como pré-tratamento e / ou pesquisa de outros pré-tratamentos, bem como o estudo de pressões de trabalho mais elevadas e outros valores de velocidade superficial de CO<sub>2</sub>.

Findo este trabalho, sugere-se como objectos de estudo de trabalhos futuros:

- Extracção de carotenóides por CO<sub>2</sub> supercrítico utilizando uma pressão de trabalho superior a 220 bar;
- Combinação do processo de extrusão como tratamento prévio do repiso com a utilização de enzimas que facilitem a solubilização das fibras insolúveis da parede celular.

## 9. Referências Bibliográficas

Almeida, D. (2006). *Manual de Culturas Horticolas – Volume II*. 1st edition. Editorial Presença. Lisboa.

Anónimo (2003). Lycopene red as a food colorant and antioxidant, *Focus on Pigments*, 11: 7-7.

Antunes, S. (2007). *Micronização Supercrítica do  $\beta$ -Caroteno*. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Técnico. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa. 72 p.

Arab, L. e Steck, S. (2000). Lycopene and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*, 71 (Suppl): 1691-1695.

Araújo, M. E. *Terpenóides*. Disponível em: [http://www.dqb.fc.ul.pt/cup/44361/aulas-44361/QPN\\_Terpenoides\\_2\\_\\_09\\_10.pdf](http://www.dqb.fc.ul.pt/cup/44361/aulas-44361/QPN_Terpenoides_2__09_10.pdf). Acesso em: 02/10/2009.

Barringer, S. (2004). Frozen tomatoes. In Hui, Y., Ghazala, S., Graham, D. (Eds.), *Handbook of Vegetable Preservation and Processing*. Marcel Dekker, INC. New York. Pp. 293–308.

Barros, S.B.C.T. (2008). Metodologias integradas para a conservação de kiwi minimamente processado. Tese de Doutoramento. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.

Baysal, T.; Ersus, S. e Starmans, D.A.J. (2000). Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of  $\beta$ -Carotene and Lycopene from Tomato Paste Waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 5507–5511.

Beecher, G. R. (1998). Nutrient content of tomatoes and tomato products. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 218 (2): 98-100.

Belitz, H. D., Grosch, W. e Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. 4th edition. Springer. Berlin. 1070 p.

Bernardo-Gil, M. G., Ribeiro, M. A. e Esquível, M. M. (2002). Produção de extractos para a indústria alimentar. Uso de fluidos supercríticos. *Boletim de Biotecnologia*, 73: 24-30.

Brunner, G. (1983). Selectivity of supercritical compounds and entrainers with respect to model substances. *Fluid Phase Equilibr.*, 10: 289–298.

Brunner, G. (1994). *Gas extraction*. Springer. New York.

Cadoni, E., Giorgi, M. R., Medda, E., e Poma, G. (2000). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of lycopene and b-carotene from ripe tomatoes. *Dyes Pigm.*, 44: 27–32.

Carvalho, J.L. e Pagliuca, L.G. (2007). Tomate, um mercado que não pára de crescer globalmente. *Hortifruti Brasil*, 58: 6-14.

Cheah, E. L. C., Chan, L. W. e Heng, P. W. S. (2006). Supercritical carbon dioxide and its application in the extraction of active principles from plant materials. *Asian J. Pharm. Sci.*, 1(1): 59-74.

- Choksi, P. M. e Joshi, V. Y. (2007). A Review on Lycopene - Extraction, Purification, Stability and Applications. *International Journal of Food Properties*, 10(2): 289 – 298.
- Ciruelos, A., González, C., Latorre, A., Ruiz, R.M. e Rodriguez, A. (2001). Effect of heat treatment on the pectin of tomatoes during tomato paste manufacturing. *Acta Hortic.*, 542: 181-186.
- Cosgrove, D.J. (2005). Growth of plant cell wall: a review. *Nature*, 11/2005,6: 850-861.
- Costa, J.M. e Heuvelink, E. (2005). Introduction: The tomato crop and industry. In Heuvelink, E. (Ed.), *Tomatoes*. CABI Publishing. Cambridge. Pp. 1-20.
- Coulter, T. P. (2009). *Food: The Chemistry of Its Components*. 5th edition. RCS Publishing. Cambridge.
- De la Fuente, J. C., Oyarzún, B., Quezada, N. e Del Valle, J. M. (2006). Solubility of carotenoid pigments (lycopene and astaxanthin) in supercritical carbon dioxide. *Fluid Phase Equilib.*, 247(1–2): 90–95.
- De Vries, J.W. (2003). On defining dietary fibre. *Proceed. Nutrition Society*, 62: 37-43.
- Del Valle, M., Camara, M. e Torija, M. E. (2006). Chemical characterization of tomato pomace. *J. Sci. Food Agr.*, 86 (8): 1232-1236.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R. e Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains – Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit. Rev. Food. Sci.*, 40 (3): 173-289.
- Eggers, R. (1996). Supercritical fluid extraction (SFE) of oilseeds/lipids in natural products. In King, J. W. e List, G. R. (Eds.), *Supercritical fluid technology in oil and lipid chemistry*. AOCS Press. Pp. 35–65)
- Food and Agriculture Organization (2009). Food and Agricultural commodities production. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: 09 / 09 / 2009.
- Gabinete de Planeamento e Políticas (2007). *Horticultura*. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa. 17 p.
- Gidenne, T., Carabano, R., Garcia, J. e de Blas, C. (1998). Fibre Digestion in the nutrition of the rabbit. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 69-88.
- Giovannucci, E.; Ascherio, A.; Rimm, E. B.; Stampfer, M. J.; Colditz, G. A. e Willett, W. C. (1995). Intake of Carotenoids and Retinol in Relation to Risk of Prostate Cancer. *Journal Natl. Cancer Inst.* 87:1767 – 1776.
- Gómez-Prieto, M. S., Caja, M. M. e Santa-Maria, G. (2002). Solubility in supercritical carbon dioxide of the predominant carotenes of tomato skins. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79(9), 897-902.
- Goodman, M. T.; Kiviat, N.; McDuffie, K.; Hankin, J. H.; Hernandez, B.; Wilkens, L. R.; Franke, A.; Kuypers, J.; Kolonel, L. N.; Nakamura, J.; Ing, G.; Branch, B.; Bertman, C. C.; Kamemoto, L.; Sharma, S. e Killeen, J. (1998). The Association of Plasma Micronutrients with the Risk of Cervical Dysplasia in Hawaii. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 7:537 – 544.



- Ha, M-A., Jarvis, M.C., Mann, J.I. (2000). Review: A definition for dietary fibre. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54: 861-864.
- Harper, J.M. (1981). *Extrusion of Foods*. CRC Press. Boca Raton.
- Ibrahem, H. M. e Alwash, A. H. (1983). The effect of different ratios of tomato pomace and alfalfa in the ration on the digestion performance of lambs. *World Rev. Anim. Prod.*, 29: 31–35.
- Johannsen, M.; Brunner, G. (1997). Solubilities of the Fat-Soluble Vitamins A, D, E and K in Super-critical Carbon Dioxide. *J. Chem. Eng. Data*. 42: 106 – 111.
- Instituto Nacional de Estatística (2008). *Estatísticas Agrícolas 2007*. Instituto Nacional de Estatística. Lisboa. 115 p.
- Kirk, J. T. O. e Tilney-Basset, R. A. E. (1978). *The Plastids. Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance*. 2nd edition. Elsevier. Amsterdam.
- Kohlmeir, L.; Kark, J. D.; Gomez-Garcia, e.; Martin, B. C.; StecK, S. E.; Kardinal, A. F. M.; Ringstad, J.; Thamm, M.; Masaev, V.; Riemersma, R.; Martinmoreno, J. M.; Huttunen, J. K. e Kok, F. J. (1997). Lycopene and Myocardial Infarction Risk in the EURAMIC Study. *Am. Journal Epidemiol.*, 146: 618–626.
- Lang, Q. e Wai, C.M. (2001). Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - a practical review. *Talanta*. 53:771-782.
- Lurie, S.; Handros, A.; Fallik, E. e Shapira, M. (1996). Reversible Inhibition of Tomato Fruit Gene Expression at High Temperature. *Plant Physiology*, 110: 1207 – 1214.
- Madhavi, D.L. e Salunkhe, D.K. (1998). Tomato. In Salunkhe, D.K. e Kadam, S.S. (Eds.), *Handbook of Vegetable Science and Technology: Production, Composition, Storage and Processing*. Marcel Dekker, INC. New York. Pp. 171-202.
- Maiani, G. et al (2009). Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol. Nutr. Food Res.*, 53: S194–S218.
- Martins, M. M. (1995). *Produção de Extractos de Aroma de Thymus zygis L.: Extracção por CO<sub>2</sub> Supercrítico versus Métodos Convencionais*. Tese de Doutoramento. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- Martins, C. A. S. (2009). *Efeito da Utilização de Dreches de Cerveja na Digestibilidade, Actividade Fermentativa e Morfologia Intestinal do Leitão ao Desmame*. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa. 69 p.
- May, B. (2004). Dehydrated tomatoes. In Hui, Y., Ghazala, S. e Graham, D. (Eds.), *Handbook of Vegetable Preservation and Processing*. Marcel Dekker, INC. New York. Pp. 395–408.
- Macdougall, D. B. (2002). *Colour in food. Improving Quality*. Woodhead Publishing Limited. Cambridge. 367 p.
- McDougall, G.J., Morrison, I.M., Stewart, D., Hillman, J.R., (1996). Plant cell walls as dietary fibre: Range, structure, processing and function. *J. Sci. Food Agric.*, 70, 133-150.

McHugh, M. A. e Krikonis, V. J. (1986). *Supercritical Fluid Extraction. Principles and Practice*. Butterworths. Massachussetts.

Medina, I.; Bueno, J. L. e Coca, J. (1988). *Extracción supercrítica: Fundamentos y aplicaciones*. Ingeniería Química. Pp. 231 - 234

Melo, P. C. Produção de sementes de tomate. Disponível em: [http://www.abhorticultura.com.br/downloads/Paulo%20C%C3%A9sar2\\_Prod\\_sem\\_%20tomate.pdf](http://www.abhorticultura.com.br/downloads/Paulo%20C%C3%A9sar2_Prod_sem_%20tomate.pdf). Acesso em: 14/09/2009.

Mínguez – Mosquera, M.I., Hornero – Méndez, D. e Pérez-Gálvez, A. (2008). Carotenoid and provitamin A in functional foods. In Hurst, W. J. (Ed.), *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*. CRC Press. Boca Raton. Pp. 277-336.

NF V05-128 (1984). Fruits, Légumes et Produits dérivés. Détermination des substances pectiques.

Nobre, B.P., Palavra, A. F., Pessoa, F. L. P. e Mendes, R. L. (2009). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of trans-lycopene from Portuguese tomato industrial waste. *Food Chem.*, 116: 680–685

Ollanketo, M., Riekkola, K. H. M. e Hiltunen, Y. H. R (2001). Supercritical carbon dioxide extraction of lycopene in tomato skins. *Eur. Food Res. Technol.*, 212: 561–565.

Ötles, S. e Çagindi, Ö. (2008). Carotenoids as food colorants. In Socaciu, C. (Ed.), *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*. CRC Press. Boca Raton. Pp. 51 – 70.

Pereira, M. S. A (2005). *Purificação de uma endo-poligalacturoase, produzida por Kluyveromyces marxianus, utilizando sistema de duas fases aquosas*. Tese de Doutorado. Escola de Engenharia. Universidade do Minho. Braga. 192p.

Pond, N.G., Church, D.C., Pond, K.R., Schoknecht, P.A. (2005). Nutrient metabolism. In: Basic animal nutrition and feeding, 5th Ed. J. Willey and Sons, Inc. 25-290.

Pourchet-Campos, M.A. (1988). Fibra e nutrição. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 22, (3/4): 167-171.

Radhava, R. e Calderone, S. (1985). Hazard analysis of supercritical extraction. *Chem. Eng. Prog.*, 6: 59-62.

Ranganna, S. (1986). *Handbook of analysis and quality control for fruit and vegetable products*. 2nd edition. Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited. New Delhi. 1112 p.

Reverchon, E. e De Marco, I. (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J. Supercrit. Fluid.*, 38(2): 146–166.

Ribeiro, M. A., Esquível, M. M. e Bernardo-Gil, M. G.(2007). A Extração supercrítica e os antioxidantes naturais. *Ingenium*, Março/Abril: 141-143.

Rizo, P. e Porrini, M. (1997). Determination of Carotenoids in Vegetable Foods and Plasma. *Int. Journal Vit. Nutr. Res.*, 67: 47 – 54.

Robertson J. B. e Van Soest P. J. (1981). The detergent system of analysis and its application to human foods. In James W. P. T. e Theander O. (eds.). *The Analysis of Dietary Fiber in Food*. Marcel Dekker, New York. Pp. 123-158.

Roca, M. (2009). *Valorização do Tomate Nacional. Extração de Licopeno por CO<sub>2</sub> Supercrítico a partir de Repiso de Tomate*. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa. 68 p.

Rock, C. L. e Swendseid, M. F. (1992). Plasma  $\beta$ -carotene Response in Humans after Meals, Supplemented with Dietary Pectin. *Am. Journal Clin. Nutr.*, 55: 96 – 99.

Rodriguez - Amaya, D.B. (1999). Latin American food sources of carotenoids. *Arch. Latinoam. Nutr.*, 49 (1):74-84.

Rodriguez - Amaya, D.B. (2002). Brazil: a bounty of carotenoid source. *Sight and life newsletter*, 4: 3-9.

Rozzi N. L., Singh, R. K., Vierling, R. A. e Watkins, B. A. (2002). Supercritical fluid extraction of lycopene from tomato processing byproducts. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 2638-2643.

Ruiz del Castillo, M. L., Gómez-Prieto, M. S., Herraiz, M. e Santa-Marí, G. (2003). Lipid composition in tomato skin supercritical fluid extracts with high lycopene content. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 80: 271–274.

Sábio, E., *et al.* (2003). Lycopene and  $\beta$ -carotene extraction from tomato processing wastes using supercritical CO<sub>2</sub>. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 42(25): 6641–6646

Sabirzyanov, A. N., Il'in, A. P., Akhunov, A. R. e Gumerov, F. M. (2002). Solubility of water in supercritical carbon dioxide. *High Temp.*, 40(2): 231–234.

Sass-Kiss, A., Kiss, J., Milotay, P., Kerek, M.-M. e Toth-Markus, M. (2005). Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food Res. Intern* 38: 1023-1029.

Schieber, A. e Carle, R. (2005). Occurrence of carotenoid cis-isomers in food: Technological, analytical, and nutritional implications. *Trends in Food Science & Technology*, 16 (9): 416-422.

Schwartz, S. J., Hadley, C. L., Miller, E. C. e Clinton, S. K. (2002). Chemistry, bioavailability and health benefits of lycopene and other carotenoids in tomato products. *Second international congress on pigments in foods*. Lisbon. Pp. 61–69.

Sharma, S. K., e Le Maguer, M. (1996). Lycopene in tomatoes and tomato pulp fractions. *Ital. J. Food Sci.*, 2:107–113.

Shi, J. e Le Maguer, M. (2000). Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing. *Crc. Cr. Rev. Food Sci.*, 40(1): 1–42.

Shi, J., Maguer, M. L. e Bryan, M. (2002). Lycopene from tomatoes. In Shi, J., Mazza, G. e Maguer, M. L. (Eds.), *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects Vol. 2*. CRC Press LLC, Boca Raton. Pp 135–168.

Shi, J., Mittal, G., Kim, E. e Xue, S. J. (2007). Solubility of Carotenoids in Supercritical CO<sub>2</sub>. *Food Rev. Int.*, 23:4: 341–371.

Silva, M.I. (2002). *Estudo do Equilíbrio de Fases de Sistemas Relevantes para o Processo de Desalcoolização de Vinho por Extração Supercrítica*. Tese de Doutoramento. Faculdade de Engenharia. Universidade do Porto. Porto. 284 p.

Silva, A. (2008). *Estudo da Extrusão Termoplástica nas Características Físico-Químicas e Nutricionais do Rúmen Bovino e sua Aplicação na Alimentação Humana*. Tese de Doutoramento. Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo. São Paulo. 177 p.

Southgate, D.A.T. e Englyst H. (1985). Dietary fibre: Chemistry, physical properties and analysis. *In: Dietary fibre, fibre-depleted foods and disease*. Ed. Trowell, Burkitt D., Heaton K., London, 31-35.

Spanos, G. A.; Chen, H; Schwartz, S. J. (1993). Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of  $\beta$ - carotene from Sweet Potatoes. *Journal of Food Science*, 58: 817 – 820.

Taiz, L. e Zeiger, E (2006). *Plant Physiology*. 4th edition. Sinauer Associates, Inc. 705 p.

Tomato News (2003). Portugal: trade statistics. *Tomato News*, October.

Toor, R.-K., Savage, G.-P. e Lister, C.-E. (2006). Seasonal variations in the antioxidant composition of greenhouse grown tomatoes. *J. Food Comp. Anal.*, 19: 1–10.

Topal, U. *et al.* (2006). Extraction of lycopene from tomato skin with supercritical carbon dioxide: effect of operating conditions and solubility analysis. *J. Agric. Food Chem.* 54: 5604-5610.

Trigo, R. J. S. (1997). *Estudo comparativo de processos de extração de aroma de Poejo (Mentha pulegium L.)*. Relatório do Trabalho de Fim de Curso. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.

United States Department of Agriculture (2009). *USDA National Nutrient Database for Standard Reference: Release 22*. Disponível em: [http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list\\_nut\\_edit.pl](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl). Acesso em: 12/10/2009.

Vági, E., Simándi, B., Vászrhelyiné, K. P., Daood, H., Kéry, Á., Doleschall, F., *et al.* (2007). Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids, tocopherols and sitosterols from industrial tomato by-products. *J. Supercrit. Fluids*, 40: 218–226.

Yen, G.C. e Lin, H.T. (1998). High pressure and heat treatment effects on pectic substances in guava juice. *J. Food Sci.*, 63 (4): 684-687.

Yi, C., Shi, J., Xue, S. J., Jiang, Y. e Li, D. (2009). Effects of supercritical fluid extraction parameters on lycopene yield and antioxidant activity. *Food Chem.*, 113: 1088–1094.

## 10. Anexos

### Anexo I – Protocolo sobre o Fraccionamento da Fibra: NDF, ADF e ADL

- **Método e referência:** Sistema detergente modificado - Robertson & Van Soest, 1981.

- **Equipamento**

Sistema Fibertec M (Tecator)

- o Unidade de Extração a quente (1020).
- o Unidade de Extração a frio (1021)

- **Solução detergente Neutra - NDS --1 litro**

Titriplex III - 18,61 g

(O EDTA e o NaOH podem ser substituídos por  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  EDTA - Ácido etileno diamino tetraacético sal dissódico dihidratado)

Lauril sulfato de sódio (Lab. grade) - 30,0 g

Tetra borato de sódio decahidratado  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  - 6,81 g

Fosfato ácido dissódico anidro (PA).  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - 4,56 g

Etilenoglicol - 10 ml

- **Preparação:**

- a) Dissolva o Titriplex III e o  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  em  $\text{H}_2\text{O}$  destilada num copo de precipitação.
- b) Dissolva separadamente  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  em cerca de 22 ml de água quente.
- c) Junte os compostos dissolvidos num balão volumétrico de 1 litro.
- d) Dissolva o lauril sulfato de sódio em cerca de 440ml de água precipitação e adicione aos outros compostos.
- e) Adicione o etilenoglicol para controle de espuma se necessário.

- f) Junte a água necessária para completar 1 litro e mexa bem.
- g) No dia seguinte, determine o pH da solução que deve estar entre 6,9 e 7,1; pode ser ajustado se necessário com NaOH ou HCl.
- h) Se a solução precipitar, o que acontece a menos de 20 °C, pode ser redissolvida pelo calor.

– **Determinação:**

- a) Pese 0,5 a 1 g de amostra nos cadinhos.
- b) Coloque os cadinhos na unidade de extração a quente.
- c) Junte 100 ml de solução detergente neutra fria (se necessário amilase termoestável 0,4 ml termamyl 121 L).
- d) Ligue o aquecimento de modo a levar à ebulição rapidamente.
- e) Ajuste o calor de modo a permitir uma ebulição lenta mas que mantenha as partículas em suspensão.
- f) Uma hora após o início da ebulição desligue o aquecimento e filtre.
- g) Lave 3 a 4 vezes com água destilada quente para retirar a solução detergente.
- h) Lavar duas vezes com acetona (unidade de extração a frio).
- i) Coloque os cadinhos na estufa a 105°C durante a noite, arrefecer em excicador e pesar.

– **Cálculos**

MS - Matéria seca residual da amostra.

Peso da toma - (Z)

Peso do cadinho vazio - (A).

Peso cadinho + resíduo seco - (A<sub>1</sub>)

$$\% \text{ NDF} = [(A_1 - A) / Z \times 100] / \text{MS}$$

**ADF (Fibra - Ácido - Detergente)**

– **Solução (detergente ácida)**

---

Ácido Sulfúrico...	1 N
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (P A).....	54,5 ml (balão 2 L)
Brometo de cetil trimetil amónio.....	40.0 g

Dissolver o brometo num copo com um pouco de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 N) e juntar ao restante contido no balão volumétrico de 2 L.

### **Determinação:**

- Pese 0,5 g a 1 g de amostra nos cadinhos (determinação não sequencial do ADF); No resíduo do NDF contido nos cadinhos, junte 100 ml de solução detergente ácida (determinação sequencial do ADF).
- Coloque os cadinhos na unidade de extracção a quente e ligue o aquecimento de modo a levar à ebulição durante 1 h.
- Após 1 h de ebulição desligar o aquecimento e filtrar.
- Lavar com água destilada quente 4 a 5 vezes.
- Tirar da unidade de extracção e lavar com acetona (2 vezes).
- Colocar os cadinhos na estufa a 105 °C durante a noite, arrefecer em excicador e pesar.

### **- Cálculos** (determinação sequencial)

MS - Matéria seca residual da amostra

Peso da toma - z

Peso do cadinho vazio - (A)

Peso do cadinho + resíduo - (B)

$$\% \text{ ADF} = [(B - A)/Z \times 100] / \text{MS}$$

### **ADL - Lenhina ácido - detergente**

#### **- Solução**

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72%

Pesar 408 g de água destilada para um balão de erlenmayer e juntar lentamente 1226 g de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (96% PA). O balão deve manter-se mergulhado em água e debaixo de água corrente.

– **Determinação:**

- a) Colocar os cadinhos com o resíduo do ADF em copos de vidro de 100 ml.
- b) Juntar  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (72%) até 2/3 do cadinho, colocar uma vareta de vidro e agitar.
- c) Após 1 h voltar a agitar e completar o volume de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (72%) que se perdeu (para o copo). Repetir este procedimento novamente após 1 hora.
- d) Filtrar (passaram 3 horas desde (b)) e lavar com água destilada quente 6 a 7 vezes até eliminar completamente os vestígios de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  verificando com um papel indicativo de pH.
- e) Colocar os cadinhos na estufa a  $105^\circ\text{C}$  durante a noite arrefecer em excicador e pesar.
- f) Colocar os cadinhos na mufla durante 3 h a  $550^\circ\text{C}$  arrefecer em excicador e pesar.

**Cálculos**

MS - Matéria seca residual da amostra

Peso da toma - Z

Peso do cadinho em (e) - D

Peso do cadinho em (f) - E

$$\% \text{ ADL} = [(D-E)/Z \times 100] / \text{MS}$$



## Anexo II – Resultados do Fraccionamento da Fibra

**Quadro 9** – Teores de NDF, ADF e ADL obtidos para as amostras de repiso extrudido não moído, extrudido moído e não extrudido moído, antes e depois da extracção.

Repiso	Antes da Extracção			Depois da Extracção		
	NDF	ADF	ADL	NDF	ADF	ADL
<b>Extrudido Não Moído</b>	49,2	38,8	22,5	49,3	38,8	22,6
<b>Extrudido Moído</b>	46,5	36,2	20,8	46,4	35,9	20,1
<b>Não Extrudido Moído</b>	44,1	34,8	19,5	47,2	38,4	21,0